ZUR GEWEBSSCHWELLUNG IN VITRO–MORPHOMETRISCHE ANALYSE AN LEBERZELLEN

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Hans-Georg Ruf

Saarbrücken

1973

1974

Aus der Fachrichtung 3.5 Medizinische Biologie der
Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

Homburg/Saar

ZUR GEWEBSSCHWELLUNG IN VITRO-MORPHOMETRISCHE ANALYSE AN LEBERZELLEN

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde

der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1 9 7 3

vorgelegt von
Hans-Georg Ruf

geb. am 8. Juni 1942 in Bolchen

Dekan: Prof. Dr. med. G. A. Jutzler
Referenten: Prof. Dr. med. G. Werner
Prof. Dr. med. W. Specht

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 12. März 1974

Einleitung

Aus einer Vielzahl von Untersuchungen geht hervor, daß inkubiertes Gewebe auf Schädigungen verschiedenster Art uniform mit einer Anschwellung reagiert (POPPER und SCHAFFNER). Dabei wird die Membranfunktion gestört und es kommt zur Aufnahme von Wasser und gelösten Substanzen in die Zelle. Grundsätzlich läßt sich dieses Phänomen so deuten, daß infolge der Hypoxie nicht mehr genügend Energie für die Aufrechterhaltung des Jonengleichgewichts durch die Membran bereitgestellt werden kann. Je nach Dauer, Art und Intensität der Schädigung auf die Membranen der Zelle lassen sich deren selektive Permeabilitätseigenschaften reduzieren oder sie gehen irreversibel verloren. Die Aufrechterhaltung der chemischen und elektrischen Gradienten sowie des aktiven Stofftransportes erfordert Energie, welche die Zelle aus der hydrolytischen Spaltung von ATP gewinnt. Daher wird der aktive Transport z.B. durch Abkühlen oder durch Stoffwechselgifte wie Dinitrophenol viel stärker vermindert als der passive Transport, welcher durch solche Maßnahmen nur wenig beeinflußt wird. Wird die intakte Membran durch Stillegung des Stoffwechsels gestört, so treten in ihrer Wirkung im wesentlichen rein osmotische Kräfte hervor, die eine Wasserverschiebung in das Innere der Zelle verursachen (BÜCHNER et al., 1955). Da sich die Membranen einer Zelle nach Bau und Funktion unterscheiden, reagieren die einzelnen Organellen auf gleiche Stoffwechselstörungen verschiedenartig (MERKER, 1964).
Frühere Arbeiten haben gezeigt, daß es bei quantitativen Untersuchungen der Gewebsschwellung notwendig ist, zwischen Gewebe und Zelle zu differenzieren (HECKMANN, 1964). Komplizierend tritt hinzu, daß die formal innerhalb der Zelle gelegenen Strukturen, endoplasmatisches Retikulum und Kernzisterne, welche über offene Verbindungen mit dem ICR kommunizieren, dem Extracellulärraum zugeordnet werden können.

Die vorliegende Arbeit umfaßt die quantitative Analyse der morphologischen Veränderungen in Leberzellen, welche als Ausdruck der Hypoxie während der Inkubation von Gewebescheiben in Ringerlösung innerhalb einer Stunde auftreten. Um Einblick in den zeitlichen Ablauf der Vorgänge zu erhalten, sollen Gewebeproben in verschiedenen Zeitabständen nach Beginn der Inkubation fixiert und für die licht- sowie elektronenmikroskopischer Auswertung weiterbehandelt werden. Morphometrische Untersuchungen sowohl an licht- als auch an elektronenmikroskopischen Aufnahmen ermöglichen exakte quantitative Aussagen über die Volumenänderungen der ganzen Zelle wie ihrer verschiedenen Organellen (GREENGARD et al., 1972, HOPE, 197o).

Nur solche Befunde, die auf statistisch abgesicherten Werten basieren, können für eine Deutung des Schwellungsphänomens aus morphologischer Sicht neue Grundlagen liefern.

Material und Methoden

a) Inkubation und Präparation des Gewebes:
Eine männliche Albinoratte von ca. 3oog Gewicht wurde durch Dekapitieren getötet, der rechte Leberlappen für das Experiment abgetrennt, mit Wasser abgewaschen und durch Auflegen von Filterpapier getrocknet und von Blut befreit. Das Aufschneiden des Leberlappens in 1 mm dicke Scheibchen erfolgte von Hand mit einer Rasierklinge auf einem Schneidbrett. Die Herstellung der Scheibchen war innerhalb einer Minute nach dem Dekapitieren des Tieres beendet. Als Inkubationsmedium diente eine leicht modifizierte Ringerlösung (16o mM Na, 5 mM K, 165 mM Cl). Die Gewebescheibchen wurden darin bei Zimmertemperatur inkubiert, eine Probe sofort in lebensfrischem Zustand fixiert,

andere 5, 1o, 2o, 3o und 6o Minuten nach Beginn der Inkubation. Bei der Zerkleinerung in Blöckchen von ca. 1 mm Kantenlänge wurde darauf geachtet, daß nur solche fixiert wurden, welche als eine Grenzfläche die Leberkapsel besaßen. Fixiert wurde in 1% OsO4 nach Caulfield, pH 7,2 bei o - 4 Grad Celsius für zwei Stunden. Entwässerung in Azeton und Einbettung in Araldit erfolgten nach dem üblichen Schema. Die Blöcke wurden in flachen Formen so orientiert, daß die Leberkapsel einen Rand der semi- und ultradünnen Schnitte bilden mußte. Aus diesem durch das Zurechtschneiden nicht betroffenen Rand wurde später die optimal erhaltene Zone- in der Regel nur wenige Zellagen- an Hand lichtmikroskopischer Kontrollschnitte ausgewählt. Um den Einfluß der Fixation auf die Ultrastrukturen zu kontrollieren, wurde frisches Lebergewebe mit 2,5% Glutaraldehyd in o,1 M Phosphatpuffer, pH 7,2 in zwei Stunden bei o-4 Grad Celsius vorfixiert, danach gründlich in mehrmals gewechseltem Puffer 1 Stunde gewaschen, mit 1% OsO4 nach Caulfield, pH 7,2 in zwei Stunden nachfixiert und wie oben weiterbehandelt. Semidünnschnitte von o,5 - 1 µm Dicke für die Lichtmikroskopie und Serien ultradünner Schnitte von mattgoldener Interferenzfarbe für die Elektronenmikroskopie wurden mit Glasmessern am Ultramikrotom OmU2 von Reichert hergestellt.

Die Semidünnschnitte wurden mit Methylenblau gefärbt, die Ultradünnschnitte mit Uranylacetat und Bleizitrat nach Reynolds doppelkontrastiert. Die Leberkapsel diente zur Orientierung, Zellen unmittelbar unter der Leberkapsel waren teilweise geschädigt. Die Aufnahmen wurden daher von Zellen der zweiten und dritten Zellage gewonnen.

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden am Ultraphot von Zeiss, die elektronenmikroskopischen mit dem Elmiskop I von Siemens bei 8o kV und 5oµm Aperturblende gemacht. Aufnahmen bei Primärvergrößerung von 2ooo x und 8ooo x.

b) Messung der Kern und Zellvolumina aus lichtmikroskopischen Aufnahmen

Für jede festgelegte Inkubationsdauer kamen unabhängig voneinander

ca. 5oo Kerne und 8oo Zellen zur Ausmessung. Dazu wurden die mikroskopischen Präparate zunächst unter 5oo facher Vergrößerung fotografiert und anschließend um den Faktor 1,45 nachvergrößert. Zur Ausmessung kamen nur solche Zellen und Kerne, deren Umrisse deutlich zu erkennen und die mit Wahrscheinlichkeit etwa in Äquatorialebene getroffen waren. Zur Verdeutlichung wurden die Umrisse der Zellen und Kerne nachgezeichnet (Abb. 1+2) und dann auf dem Teilchengrößen- Analysator von Zeiss ausgemessen. Die gefundenen Durchmesser wurden in Volumina umgerechnet und anschließend gemittelt. Um eine Kontrolle der Signifikanz für die erhobenen Befunde zu erhalten, wurde schließlich die Standardabweichung der Mittelwerte errechnet. Sie liegt zwischen o,o1 und o,o5 (Tab. 1).
Diese Methode zur Bestimmung von Zell- und Kernvolumina ist mit einigen systematischen Fehlerquellen behaftet:
1. verfälschen Fixation und Einbettung absolute Zellgrößen
2. sind nicht alle Schnitte Äquatorialschnitte
3. werden die in der Regel hexagonalen Zellen durch die runde Irisblende des Teilchengrößen- Analysators nicht exakt abgedeckt.
Diese systematischen Fehler fallen weniger bei Relativwerten ins Gewicht, können aber Absolutwerte verfälschen, so daß diese mit einigem Vorbehalt zu bewerten sind.

c) Morphometrische Analyse der elektronenmikroskopischen Aufnahmen
Über das zu diesen Messungen verwendete Punktzählverfahren, seine mathematischen Grundlagen und Fehlermöglichkeiten, sei auf die Arbeiten von WEIBEL(1966+1969), LOUD(1966), HAUG(1955,1967) und SITTE(1967) verwiesen. Die statistische Analyse umfaßte die Berechnung der Mittelwerte für die einzelnen Zellorganellen in Realation zum Cytoplasma, bzw.

das Verhalten von Kern,ICR und Cytoplasma sowie ihre mittleren Standardabweichungen bei der lebensfrischen Zelle sowie nach verschieden langer Inkubation. Die Schnittpunkte eines auf eine Plexiglasplatte eingeritzten Koordinatenrasters dienten als Zählpunkte. Die Auswertung erfolgte an Hand von Vergrösserungen im Format 18x24. Gezählt wurden die auf die jeweiligen Strukturen fallenden Kreuzpunkte des Rasters (Abb.3); wurde eine Organelle von einem Kreuzpunkt nur berührt, so galt dies als halber Punkt. Wir wählten ein Raster mit 1o mm Gitterabstand; Raster von kleinerem Abstand erschwerten die Auswertung, ohne die Genauigkeit entsprechend zu heben (SITTE,1957, SCHMITT, 1971). Die nach diesem Verfahren ermittelten Relativwerte einzelner Zellstrukturen wurden auf Volumenanteile bezogen. Sie wurden einmal(bei der Untersuchung Kern,Cytoplasma, ICR) in Relation zum Gewebevolumen gebracht, das andere Mal (bei der Betrachtung der Zellorganellen) auf das Zellvolumen abzüglich Kern bezogen. Pro Serie wurden durchschnittlich 15 elektronenmikroskopische Bilder ausgewertet und die Standardabweichungen der Mittelwerte errechnet (Tab. 2+3).

Ergebnisse

1. lichtoptische Befunde

a) Morphologie

Die einzelnen Bestandteile des Lebergewebes erfahren während der Inkubation folgende Veränderungen. Auffallend ist ein stetiges, anfangs starkes, später geringer werdendes Anwachsen der Zellvolumina, begleitet von einem anhaltendem Schrumpfen des Kerns bis zur 3o. Minute. Danach ist diese Größenentwicklung des Kerns rückläufig, erreicht jedoch bis zur 6o. Minute den Ausgangswert nicht mehr (Abb. 4-9).

Innerhalb des Kerns treten Veränderungen an Karyoplasma sowie dem Nukleolus auf. Die anfänglich gleichmäßig verteilte, relativ kontrastarme Chromatinstruktur vergröbert sich bereits nach 5 Minuten, verklumpt teilweise und kondensiert an der Kernwand, wodurch der als Kernwandhyperchromatose bekannte Kontrastunterschied zwischen Kernpheripherie und Innenraum auftritt (DAVID, 1965). Eine Auflockerung der anfangs glatten Kernkontur deutet schon lichtmikroskopisch auf einen beginnenden Schrumpfungsprozess hin. Nach 1o Minuten Inkubation hat sich das Chromatingerüst am Rande weiter verdichtet, im Inneren treten Chromatinschollen auf. Auch am Nukleolus, der zu Beginn der Inkubation sehr aufgelockert wirkt, laufen Verdichtungs- und Pyknosevorgänge ab; zusätzlich verlagert er sich allmählich in Richtung Kernwand. Die histologisch erkennbaren Veränderungen des Kerns haben nach 2o Minuten Inkubation einen Stillstand erreicht. Sie entsprechen jetzt dem lichtmikroskopischen Bild des Glanzkernes, und stellen damit erste sichere Zeichen des beginnenden Kerntodes dar(MEESEN, 1961). Später verstärkt sich lediglich die Unregelmäßigkeit der Kernkontur. In zunehmenden Maße dilatiert dabei die perinukleäre Zisterne. Es kommt jedoch nirgends zu einer Ruptur der Kernhülle,

so daß der Kern als solcher innerhalb des Cytoplasmas erhalten bleibt. Im Cytoplasma laufen Kondensations-, Schwellungs- und Vakuolisierungsprozesse parallel nebeneinander ab; diese ergeben lichtoptisch in der ersten Phase der Inkubation eine verstärkte schollige Färbung, welche anschließend von einer zunehmenden Aufhellung abgelöst wird.

b) Morphometrische Daten

Die gefundenen Werte für Kern- und Zellvolumina sind in Tabelle 1 aufgeführt und die sich daraus ergebenden Veränderungen in Abhängigkeit der Inkubationszeit im Diagramm 1 zur Darstellung gebracht worden. Von einem Ausgangswert von 5191 μ^3 schwellen die durchschnittlichen Zellvolumina nach 6o Minuten Inkubation um das 1,49 fache auf 7754 μ^3. Hierbei ist mit etwa 1ooo μ^3 der Volumenzuwachs zwischen 2o und 3o Minuten am größte, zwischen 3o und 6o Minuten mit ca. 45o μ^3 am geringsten. Die in unserer Messreihe gefundenen Absolutwerte der Zell- und Kernvolumina zu Beginn der Stoffwechselschädigung stehen in guter Übereinstimmung mit Daten entsprechender Untersuchungen anderer Autoren (WEIBEL, 1966+1969, ROHR et al., 197o).

Bis 3o Minuten ist die Größenentwicklung der Kerne der der Gesamtzelle gegenläufig. Die Kerne (Anfangswert 276 μ^3) schrumpfen um das 1,4o fache ihres Ausgangswertes auf 196 μ^3, um dann wieder anzuschwellen, ohne jedoch nach 6o Minuten ihren Ausgangswert zu erreichen. Der gemessene Absolutwert des mittleren Kernvolumens liegt auch hier in der durch frühere Untersuchungen bekannten Größenordnung (3oo μ^3)(Weibel, 1966).

2. elektronenmikroskopische Befunde

a) Morphologie

Zu Versuchsbeginn entspricht die Ultrastruktur der unbehandelten Leberzelle dem bekannten Bild (Abb. 10a+b).
Der Kern ist meist oval, mit regelmäßiger Kontur, der Inhalt zeigt homogene feingranuläre Chromatinverdichtungen, der Nukleolus erscheint aufgelockert; er läßt sich in dieser Phase in seine beiden Bestandteile, die pars amorpha und das Nukleolonema differenzieren.
Der Disse'sche Raum ist schmal, die Zelloberfläche an dieser Seite durch reichlich Mikrovilli vergrößert. Über die Schnittfläche finden sich in der mäßig elektronendichten Grundsubstanz die Organellen gleichmäßig verteilt. Die Mitochondrien sind überwiegend oval oder gestreckt, von etwas unterschiedlicher Größe; die Cristae sind als schmale Doppellamellen scharf gezeichnet, die Matrix relativ elektronendicht. In der Nähe der Gallenkapillaren liegt der Golgi-Aparat mit den sogenannten peribiliären Körperchen.
Das Cytoplasma der normalen Rattenleberzelle zeichnet sich weiter durch größere Komplexe von parallel gepackten Membransystemen aus, dem granulären endoplasmatischen Retikulum, das mit Ribosomen besetzt ist. Daneben kommen zahlreiche freie Ribosomen vor. Die Lichtungen der Zisternen sind eng, Verbindungen sind selten sichtbar. Die Mitochondrien stehen in deutlicher Beziehung zu diesem Teil des endoplasmatischen Retikulums. Das agranuläre endoplasmatische Retikulum besteht aus kleinen Bläschen und schmalen Tubuli, dazwischen liegen gleichmäßig verstreut Glykogenpartikel. Die Microbodies besitzen eine dichte Matrix, fast immer weisen sie den charakteristischen Kristalleinschluß auf.
Bereits 5 Minuten nach Beginn der Inkubation treten erste Veränderungen an Kern und Cytoplasma auf (Abb. 11a+b). Im Karyoplasma zeigen sich deutliche Aufhellungs- und Verdichtungsbezirke.

Am Nukleolus ist eine mäßige Zusammenballung zu erkennen. An einigen Stellen der Kernmembran treten Einbuchtungen und Einziehungen auf. Das Cytoplasma scheint leicht stärker kontrastiert; dies könnte die Folge einer Verdichtung durch schwellende Organellen sein. Erste Veränderungen zeigt auch das endoplasmatische Retikulum, besonders dessen granulärer Teil, welcher sich erweitert und gelegentlich in einzelne bläschenförmige, von Ribosomen besetzte Bruchstücke zerfällt. Die anfangs feststellbare Beziehung zu den Mitochondrien scheint verloren zu gehen. Die Erweiterung und Vakuolisierung des granulären Retikulums schreitet langsamer voran; das dazwischen liegende Glykogen erscheint vermindert.

Auch an den Mitochondrien zeichnen sich erste Veränderungen ab. Bei Beginn der Tendenz zur Abrundung ihrer meist gestreckten Form glaubt man, eine geringgradige Schwellung zu erkennen. Die Cristae sind unverändert, die Matrix hat sich aufgehellt. Das Golgi-Feld ist bei der Leberzelle schwach entwickelt, so daß augenfällige Veränderungen nicht festgestellt werden können. Der Inhalt der Lysosomen hat sich konzentriert, an ihrer Membran entsteht dadurch ein heller Spalt. Auffallend elektronendicht nach der erster 5 Minuten sind die Microbodies, die Matrix ist körnig dunkel, ohne dass sie sich dabei von der Membran zurückzieht. Der Kristall bleibt erhalten. Anscheinend gleich breit wie zu Beginn ist der Disse'sche Raum; die Mikrovilli erscheinen etwas angeschwollen.

1o Minuten nach Inkubationsbeginn sind gegenüber der gesunden Leberzelle auffallende pathologische Transformationen erkennbar (Abb. 12a+b). Bei deutlich vergrößertem Zellvolumen schrumpft der Kern weiterhin. Der Nukleolus ist verklumpt, so daß einzelne Bestandteile kaum mehr differenzierbar sind. Stellenweise hat sich die Kernzisterne von der Membran abgelöst und erweitert. Während die Mitochondrien sich weiterhin abrunden, bleiben ihre Cristae intakt, die Zahl der osmiophilen Mitochondriengranula scheint vermindert, die Matrix stellenweise unterge-

gangen; manche Mitochondrien sind unverändert erhalten geblieben. Bemerkenswert ist der zu diesem Zeitpunkt stark fortgeschrittene Schwellungszustand des Ergastoplasmas. Die noch vorhandenen Zisternen sind stark dilatiert, meist sind sie jedoch in längliche Vesikel zerfallen. Dagegen zeigt sich an dem agranulären Teil des endoplasmatischen Retikulums eine nur geringgradig ausgeprägte Vesikelbildung. Der Glykogengehalt ist infolge der anaerob verlaufenden Glykolyse weiter vermindert; man findet es in der Nähe der agranulären Vesikel, gelegentlich auch nahe der Zellmembran vor. In Beziehung zu diesem glatten Teil des endoplasmatischen Retikulums stehen offenbar auch die Microbodies (vergleiche HÜBNER u. ROHR, 1969), welche wieder an Kontrast verlieren und deren Matrixstruktur ein scholliges Aussehen annimmt.

Das Bild der Leberzelle nach 2o Minuten Inkubation wird jetzt in zunehmenden Maße durch das Auftreten von elektronenoptisch leeren membranbegrenzten Vakuolen und Vesikeln beherrscht (Abb.13a+b). Das Plasma beginnt heller zu werden. Der Kern scheint an Größe und Struktur unverändert zu bleiben; deutlich läßt sich die erweiterte perinukleäre Zisterne darstellen. An dem granulären Teil des endoplasmatischen Retikulums spielen sich gegenüber dem vorhergehenden Stadium außer der oben beschriebenen Fragmentation keine entscheidenden Änderungen mehr ab. In einzelnen Zellen rücken die Felder gegen die Zellperipherie. Häufig liegen die Ribosomen losgelöst von den Membranen in der Umgebung verstreut. Die Auflösung der Tubuli in Vesikel ist weitgehend abgeschlossen. Die Bläschen sind deutlich kleiner als die Relikte des granulären endoplasmatischen Retikulums. Ihre Zahl scheint geringer, als nach dem vorher vorhandenen Membranmaterial zu erwarten gewesen wäre. In manchen Bezirken sieht die Grundsubstanz strukturlos und verwaschen aus. Der Glykogengehalt ist weiter reduziert, in einzelnen Zellen sogar gänzlich verschwunden. Der Abrundungsvorgang an den Mitochondrien scheint zu diesem Zeitpunkt zum Stillstand gekommen zu sein. Nach wie vor zeichnen sich die Cristae klar ab; weder zeigen sie eine Fragmentation, noch schwellen sie an. Der einzige veränderte Befund an den Mitochondrien ist eine verstärkte Osmiophilie der Matrix. Auch

an Lysosomen und Microbodies spielen sich keine wesentlichen Transformationen ab. Der Disse'sche Raum erweitert sich in zunehmenden Maße. Der ihm zugewandte Mikrovillisaum schwillt an, teils lösen sich einzelne als kleine Bläschen in das Kapillarlumen ab.

Nach einer Dauer von 3o Minuten Inkubation ergeben sich keine grundlegenden Änderungen gegenüber den vorausgegangenen Stadien, die einzelnen Befunde verstärken sich jedoch in ihrem Ausmaß (Abb. 14a+b). Die Kernmembran ist jetzt sehr unregelmäßig geworden, die Kernzisterne hebt sich deutlich ab und ist in manchen Bildern zu riesigen Vakuolen erweitert. Die Areale strukturloser Grundsubstanz treten stärker hervor. Die länglichen Vesikel des granulären Retikulums haben sich abgerundet und sind gegen Zellgrenzen vorgerückt. Nach wie vor erscheint die Zahl der über die Grundsubstanz verstreuten Ribosomen nicht vermindert. Der agranuläre Teil ist bis auf vereinzelte Vesikel zwischen den Blasen des ehemaligen granulären Retikulums verschwunden. Auch der Glykogengehalt ist weiter zurückgegangen, in manchen Bildern nicht mehr nachweisbar. An den Microbodies sowie an den Lysosomen hat sich nichts wesentliches geändert. Die Mitochondrien fallen durch eine merkliche Kontraststeigerung gegenüber 1o Minuten Inkubation auf, dabei scheinen sie zu schrumpfen, ein Vorgang, der neben Schwellungsprozessen häufiger beobachtet wird (DAVID, 1965). Eine leichte Erweiterung der Cristae mitochondriales deutet sich an.

Nach 6o Minuten fällt gegenüber 3o Minuten Inkubation ein deutlicher Verlust an Grundsubstanz auf (Abb. 15a+b). Es treten große, nicht von einer Membran begrenzten Vakuolen auf. Die Zahl der Vesikel nimmt deutlich ab; in der Mehrzahl liegen sie in der Nähe der Zellmembran. Die Glykogenpartikel sind nahezu vollständig verschwunden. Das Volumen der Mitochondrien hat sich nicht mehr geändert. Immer noch findet man nahezu ungeschädigte Mitochondrien vor. Auch ihr Kontrast hat sich kaum verringert. Auffallend sind die jetzt deutlich erweiterten Cristae. Lysosomen und Mikrobodies sind in Zahl und Struktur unverändert.

b) morphometrische Befunde

Bevor die Ergebnisse der morphometrischen Analyse im einzelnen besprochen werden, ist es notwendig, darauf hinzuweisen, daß die gefundenen Trefferprozente immer auf das Gesamtvolumen der Zelle- abzüglich des Kerns- bzw. des Lebergewebes bezogen sind. Bliebe das Volumen der Zelle über die beobachtete Zeit konstant, so wäre es möglich, über das wahre quantitative Verhalten der Organellen unmittelbar Auskunft zu geben. Da dieses jedoch für unsere Untersuchungen nicht der Fall ist, kann ein Vergleich, der diese Tatsache unberücksichtigt läßt, in die Irre führen. Um trotzdem vergleichbare Aussagen machen zu können, müssen alle Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen um den Faktor der jeweils festgestellten Vergrößerung des Zellvolumens multipliziert werden, mit anderen Worten: die elektronenoptischen Befunde müssen an Hand lichtoptischer Messungen geeicht werden. Tabelle 2+3 enthalten die übersichtlichen Daten der prozentualen Volumenanteile der Gewebskompartimenten und deren Standardabweichungen. In den Tabellen 4+5 werden die errechneten Werte um den Zuwachsfaktor der gegenüber dem Ausgangspunkt geschwollenen Leberzelle multipliziert. Die graphischen Darstellungen 2-8 sollen die erhaltenen Befunde verdeutlichen.

Der prozentuale Anteil des endoplasmatischen Retikulums am Cytoplasma ist mit 13,7% geringer als der von WEIBEL et al. (1969) an der normalen Rattenleber gefundenen (16,3%), jedoch stimmt das Verhältnis zwischen rauhem und glattem Anteil (8,75:4,98) näherungsweise überein (WEIBEL 1o:6,3). Dieser Ausgangswert zu Beginn der Inkubation steigt im Verlaufe der Untersuchung signifikant an, wobei festzustellen ist, daß der Schwellungsprozess überwiegend den granulären Teil betrifft. Das Maximum der Schwellung liegt mit 25,16% nach 3o Min. Inkubation und fällt nach 6o Min. geringfügig ab (24,68%). Dagegen ist der Höhepunkt der Anschwellung des glatten Retikulums mit 6,25%

schon nach 5 Minuten erreicht, anschließend stetiger Abfall bis zu Ende der Untersuchung auf 2,48%; dabei wird schon zwischen 1o und 2o Minuten der Ausgangswert unterschritten. Berechnet man die Prozentverschiebung ein, die sich durch die quellende Zelle ergibt, so kommt die Dilatation beider Anteile des endoplasmatischen Retikulums verstärkt zum Ausdruck. Es ergibt sich nach 3o Min. für den granulären Teil ein sehr hoher Prozentsatz am Cytoplasma des Ausgangsstadiums (35,7%), der Verlauf der Kurve bleibt jedoch prinzipiell bestehen. An dem Verhalten des agranulären Teils entstehen gleichfalls nur graduelle Unterschiede; nach 1o Min. Inkubation fällt der Wert unter den des Ausganges.

Im Gegensatz zu den starken quantitativen Volumenverschiebungen, die am endoplasmatischen Retikulum ablaufen, sind die Änderungen des Chondrioms vergleichsweise gering; sein Anteil an der Cytoplasmafläche fällt im Laufe der Inkubationszeit geringfügig aber stetig ab und erreicht bei etwa geradlinigem Verlauf nach 6o Min. 1o,65%. Interessanterweise ergibt sich bei Einberechnung des Zuwachsfaktors der schwellenden Zelle eine fast gegenläufige Entwicklung. Bis 1o Min. stagniert die Volumengröße der Mitochondrien, steigt dann bis auf 16,65% an, um nach 6o Min. wieder abzufallen (15,86%), ohne den Ausgangswert zu erreichen.

Der Microbody-Anteil liegt bei o,55% (WEIBEL 1,5%). Hier zeigt sich im Laufe der Inkubation ein geringfügiger Abfall (nach 6o Min. o,12%); rechnet man den Zuwachsfaktor ein, so bleibt die Volumengröße über die Untersuchungsdauer annähernd konstant.

Die Prozentwerte der Lysosomen schwanken zwischen o,2% und o,25%. Bei Einberechnung des Zellvolumenzuwachses ergibt sich keine signifikante Verlaufsänderung.

Das Golgi-Feld, dessen Anteil am Beginn o,28% ausmacht, verliert sich imweiteren Verlauf so stark, daß seine Berücksichtigung in den späteren Stadien entfallen mußte.

Rechnet man den Multiplikationsfaktor in den Volumenanteil der Grundsubstanz ein, so ändert sich die ursprünglich stetig abfallende Verlaufskurve in der Weise, daß jetzt eine Abnahme erst nach 2o Min. Inkubation eintritt.

Bei der morphometrischen Auswertung des Kernanteils ergeben sich stets sinkende Werte bis zu einer Dauer von 3o Min. Inkubation, danach geringfügiger Anstieg. Hier zeigen sich bei Einbeziehung des Schwellungszuwachses sehr gut vergleichbare Ergebnisse mit den lichtmikroskopisch ermittelten Absolutwerten.
Im Verhältnis der Zelle zum ICR -unter ICR werden alle Strukturen und Flüssigkeitsräume verstanden, welche sich außerhalb der Leberzelle befinden- läßt sich eine beträchtliche Verschiebung zu Gunsten der Zelle nachweisen, auch nach Einberechnung des Zuwachsfaktors. Nach 3o Min. erreicht der ICR den niedrigsten Stand, der prozentuale Anteil liegt dann weit unter der Hälfte des Ausgangswertes (8,47%).

Schließlich wurde wie schon erwähnt, eine morphometrische Analyse an einigen mit anderer Technik fixierten Blöcken (Doppelfixation in Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid) von frischem Rattenlebergewebe unternommen, um eventuelle Strukturbeeinflussungen durch das Fixationsverfahren zu verdeutlichen (Abb. 16a+b). Vergleicht man die unterschiedlich eingebetteten Zellen in der prozentualen Verteilung ihrer Kompartimente miteinander, so werden signifikante Differenzen augenfällig (Diagramm 2+9). Der Anteil des Chondrioms liegt bei Glutaraldehyd vorfixierten Zellen mit 26,24% um etwa 12% über dem allein mit OsO_4 fixierten Zelle (14,83%). Dagegen zeigt sich das endoplasmatische Retikulum (1o,83%) nach Doppelfixation deutlich gegenüber der in üblicher Weise fixierten Zelle (13,73%) vermindert; die Relation granuläres zu agranulärem Retikulum bleibt dabei annähernd erhalten.

Diskussion:

Die vorliegenden Untersuchungen an inkubierten Rattenleberscheibchen haben ergeben, daß sich bereits nach kurzer Zeit erste Volumenverschiebungen und Entdifferenzierungsprozesse an den Zellstrukturen abspielen. Die dabei auftretenden hervorstechendsten Befunde sind die lichtoptisch sichtbare ständige Volumenvergrößerung der Zelle bei anfänglich gleichzeitigem Schrumpfen des Kerns, das allerdings nach 3o Min. ebenfalls in Schwellung übergeht, sowie die starke Einengung des Extracellulärraums auf weit weniger als die Hälfte des Ausgangswertes.
Elektronenoptisch fällt das immense Anschwellen des Ergastoplasmas auf, der fortschreitende Verlust an Grundsubstanz bei zunehmender Vakuolisierung des Cytoplasmas, der stetige Glykogenverlust und die relativ geringe Beteiligung der übrigen Organellen an diesen pathobiotischen Vorgängen.

Das Zellödem als Reaktion auf eine Stoffwechselschädigung ist gut bekannt (HOFER und SCHÄFFNER). Durch weitgehendes Sistieren des Natriumpumpenmechanismus entsteht ein Einstrom von Natrium in die Zelle, verbunden mit einem Verlust an Kalium. Der größere Hydratationsmantel des Natriumions gegenüber dem Kaliumion bewirkt eine Wasserverschiebung in das Zellinnere (BÜCHERL-PLATTNER, 1955). Bei Zusatz gewisser Substrate (z.B. Zwischenprodukte des Krebszyklus, Glutaminsäure, Saccharose) kann die uneingeschränkte Funktion der Leberzelle erheblich länger erhalten bleiben; eine Schrumpfung nach Zugabe dieser Substrate wäre also eine Art Erholung der Zelle (BURCK, 1960). Einen vergleichbaren Effekt erreicht man, durch Änderung der Osmolarität und des pH Wertes, wodurch der Pumpenmechanismus bis zu einen gewissen Grade aufrecht erhalten bleibt.
Die Ergebnisse bezüglich des Verhaltens des Zellvolumens während der untersuchten Inkubationsperiode differieren zum Teil von denen welche bei gleicher Versuchungsanordnung HÜCKMANN ,(1964) beobachtet hat. Während die von uns untersuchten Zellen, wie oben beschrieben,

innerhalb einer Stunde zunehmend bis auf das 1,49 fache des Ausgangswertes schwellen, zeigt sich dort ein Maximum nach 3o Min. Inkubation bei einer Vergrößerung um das 1,7 fache. Nach 6o Min. ist allerdings wieder der gleiche Schwellungszustand erreicht wie im vorliegenden Fall. Der Grund für diese Divergenz könnte in methodischen Unterschieden liegen. Bekanntlich hat die Präparationsmethode großen Einfluß auf den Erhaltungszustand der Zellstrukturen. Quantitative Aussagen über verschiedene Gewebeproben sind daher nur zulässig, wenn genau die gleichen Präpatationsmethoden angewandt wurden. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, daß sich die Leberzellen schon nach ihrer Lage im Leberläppchen beträchtlich unterscheiden (REITH et al., 1968, LOUD, 1968), aber auch,bedingt durch die sehr geringe Penetrationsrate des Fixationsmittels, in tieferen Lagen des Gewebeblockes sehr viel schlechter erhalten werden als an der Oberfläche. Um in dieser Situation verlässliche quantitative Daten zu erhalten, ist es erforderlich, stets nur Zellen in definierter Lage zu vergleichen. Aus diesem Grunde wurde im vorliegendem Falle nur Proben eines einzigen Versuchstieres untersucht. Die orientierte Einbettung erlaubte es, auch im Elektronenmikroskop die Zellen der zweiten und dritten Lage unter der mechanisch nicht geschädigten Leberkapsel wiederzufinden.

In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von HECKMANN, 1964 steht das Verhalten des Extracellulärraums, den man in Annäherung mit dem ICR gleichsetzen darf, da der bindegewebige Anteil am Lebergewebe sehr gering ist. Zu Beginn der Inkubation nehmen die Zellen 8o,85% des Gewebevolumens ein (HECKMANN 72,9% bis 78,6%), nach 3o Min. ist dieser Wert auf 94,o3% gestiegen. und fällt nach 6o Min. wieder geringfügig ab. Der Extracellulärraum vermindert sich also mit dem ständig wachsenden Zellvolumen, bis die Leberzelle nach 3o Min. nahezu den ganzen Gewebsraum einnimmt.

Die schon oben erwähnte Reaktion des Kerns auf Stoffwechselstörungen ist in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Während ein Teil der Zellkerne durch Flüssigkeitsansammlung und Vakuolisierung des Karyoplasmas anschwillt, wird häufig

auch eine Karyopknose beobachtet, die von einer "Schlängelung" der Kernmembran eingeleitet wird, ohne daß beide Reaktionsweisen Rückschlüsse auf die Art der Schädigung zulassen (DAVID, 1961). Allen gemeinsam ist die Kernvergrößerung, eine Entdifferenzierung des Nukleolus sowie eine Abhebung der äußeren Kernmembran, wobei diese Veränderungen oft schon nach wenigen Minuten erkennbar sind. Das Chromatin verklumpt nicht nur an der Kernwand sondern auch im Zentrum des Kerns und um den Nukleolus. Wie Versuche bestätigt haben (DAVID, 1965), sind diese Kernveränderungen häufig reversibel. Da die anfänglichen histologisch feststellbaren Veränderungen an Kern und Cytoplasma als Versuch der Zelle zu deuten sind, die auf sie einwirkenden Noxen zu kompensieren (BÜCHNER et al., 1955), könnte das nach 3o Min. beginnende Anschwellen des Kerns Ausdruck für den plötzlichen Ausfall von Kompensationsmechanismen bzw. Zeichen des Übergangs der Zelle in die irreparable Phase sein.

Unter Grundsubstanz verstehen wir den wechselnd großen Anteil des Hyaloplasmas nach Abzug aller Zellorganellen, Fettablagerungen und freien Ribosomen. In der ersten Phase der Inkubation (bis etwa 2o Min.) verdichtet sich das Grundplasma erkennbar. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich darauf, daß die Grundsubstanz durch die schwellenden Organellen zusammengedrängt wird. Auf das Ausgangsvolumen der Zelle bezogen, ergibt sich in der Auswertung des prozentualen Anteils ein anfangs geringer, später zunehmender Grundsubstanzschwund, der mit einer Aufhellung des Plasmas einhergeht. Es treten elektronenoptisch annähernd leere Bezirke auf. Ungeklärt ist, ob durch die Hydratation der Zelle die Grundstruktur untergeht, oder durch die geschädigten Membranen ausgewaschen wird. In der zweiten Hälfte der Inkubation erscheinen an einigen Stellen innerhalb des Plasmas umschriebene, elektronenoptisch leere, nicht von einer Membran begrenzte Vakuolen; diese Vakuolisierung zeigt sich bei stoffwechselgehemmten Zellen regelmäßig (ALTMAN, 1955, BECKER, 196o). Mit anderen Autoren (BENNEKE und SIMON, 1961) nehmen wir an, daß

dies Ausdruck einer "aktiven" Stoffwechselleistung der Zelle sein könnte, die auf diese Weise einer weiteren Hydratation entgehen und das eingedrungene Wasser in Form von Vakuolen ausscheiden will.

Der Zustand des Ergastoplasmas (und im gewissen Grade auch der Kern) stellt einen feinen Indikator für den Funktionszustand der Zelle dar. Durch die Labilität seiner Struktur zeigt es frühzeitig Schädigungen oder Funktionsänderungen der Zelle an; grundsätzlich läßt sich zunächst nicht entscheiden, ob eine geringe Schwellung des Ergastoplasmas eine Leistungssteigerung oder -abfall bedeutet. Der Schwellungsprozess beginnt mit einer Dilatation der Zisternen, in immer stärkerem Maße fragmentiert das Kanalsystem und bildet membranbegrenzte Vakuolen, bis nach 6o Min. Inkubation die blasige Entartung erreicht ist. Aus früheren Untersuchungen geht hervor, daß dieser Vorgang meist mit einer Pyknose des Kerns einhergeht (DAVID, 1965). An diesem Schwellungsprozess ist das glatte Retikulum nur geringgradig, und nur während der ersten 1o Min. beteiligt; in weiteren Verlauf der Inkubation nimmt es zunehmend an Volumen ab. Hierbei ist zu bemerken, daß bei der strukturellen Umwandlung die Unterscheidung in einen rauhen und glatten Anteil fortschreitend schwieriger wird, so daß in späteren Stadien eine getrennte Auswertung zu Fehlinterpretationen führen kann.

Nach DALLNER, SIEKEWITZ und PALADE,(196[illegible])kann glattes E.R. durch Transformation des rauhen E.R. entstehen. Auch der gegenteilige Vorgang, die Anlagerung freier Ribosomen an das Membranmaterial des glatten Retikulums als Ausdruck einer verstärkten Proteinsynthese wird postuliert. Hierfür geben unsere Ergebnisse einen weiteren Hinweis.

Der funktionelle Zusammenhang des glatten E.R. mit dem Glykogenauf- und-abbau scheint gesichert.(THEMANN, 1961). Inwieweit eine Zustandsänderung des glatten Retikulums auf einen veränderten Glykogenstoffwechsel schließen läßt, ist ungewiß. Jedenfalls

ist bei relativ geringer Dilatation des glatten E.R. ein auffallender Glykogenschwund erkennbar, der nach 60 Min. zu vollständigen Verlust des Glykogens geführt hat. Dieser Befund wird an allen in irgendeiner Weise geschädigten Zelle beobachtet (JORDAN, 1964, ALTMANN, 1965, ROHR, STRÜBEL und BIANCHI, 1970), er ist bei invitro Untersuchungen besonders deutlich (BERNHELL-ZAZZERA et al., 1964). Die Fähigkeit der Glykogensynthese geht in vitro schon nach sehr kurzer Zeit verloren. Es besteht kein Zweifel, daß die unphysiologischen Umgebungsverhältnisse der Versuchsobjekte zusammen mit dem einsetzenden Metabolitenstau durch mangelnden Abtransport zusätzlich pathogene Faktoren darstellen, die die Kompensationsmöglichkeiten der Zelle frühzeitig erschöpfen. Die auffallende Ansammlung der Glykogenpartikeln an der Zellmembran während der zweiten Hälfte der Inkubation könnte aber auch ein Hinweis dafür sein, daß Glykogen passiv durch die geschädigte Membran ausgeschwemmt wird (HRUBAN, 1964).

Der relative Anteil des Chondrioms am Volumen der normalen Leberzelle unterliegt nach der Literatur (BÜCHNER, 1955, REITH et al.) einer großen Schwankungsbreite. Je nach Lage der Zelle im Leberläppchen treten bereits starke Unterschiede auf (LOUD, 1966, REITH et al., 1968, ZOMMER, 1971). Unser errechneter Wert liegt mit 14,8% vergleichsweise niedrig gegenüber anderen Untersuchungen (WEIBEL 23%, BÜCHNER 25%, REITH et al. in der zentralen Läppchenzone 12,3%, peripher 19,3%). Einige Autoren (DAVID, MARX und UEHLINGS, 1961) haben schon vor Jahren auf die Abhängigkeit des submikroskopischen Leberbildes von der Art des Einbettungsmittels aufmerksam gemacht. Es schien uns daher notwendig, um eventuelle Fixationsartefakte bzw. Einflüsse durch Versuchsanordnung auf die Volumenverteilung der Zellorganellen sichtbar zu machen, einige in anderer Weise (Doppelfixation in Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid) eingebettete Objekte auszuwerten. Diese entsprachen weitgehend den Arbeiten oben genannter Autoren (Abb. 16a+b, Diagramm 9).

Während das Volumen der Mitochondrien über die Dauer der Inkubation nahezu unverändert bleibt - die geringgradige Schwellung nach etwa 2o Min. zeigt keine Signifikanz - ändert sich ihre Form im Sinne einer sphärischen Transformation. Da die Kugelgestalt gegenüber anderen Formen einen maximalen Inhalt umfaßt, deutet diese Änderung zusammen mit der Aufhellung der Matrix sicherlich eine mäßige lichtmikroskopisch als "trübe Schwellung" bekannte Volumenvergrößerung an. Betrachtet man die starke Dilatation des Ergastoplasmas als Zeichen einer beträchtlichen Schädigung der Zellfunktion, so war die vergleichsweise geringgradige Transformation der Mitochondrien, welche bekanntlich sehr empfindlich auf Stoffwechselstörungen reagieren, nicht zu erwarten. Ähnliche Ergebnisse finden sich jedoch auch in anderen Untersuchungen. BERNELLI-ZAZZERA (1964) erhält an ischämiegeschädigten Rattenleberzellen, besonders bei gut gefütterten Tieren erst nach 3o Min. vollständiger Ischämie eine mäßige Transformation der Mitochondrien ohne sonstige Zeichen einer Degeneration. Auch DAVID, MARX und UEHLINGS,(1961)fanden 3o Min. nach dem Tode der Versuchstiere an den Mitochondrien der Leberzelle kaum Zeichen einer Destruktion (Inkubationstemperatur 4 Grad Celsius). Erste Veränderungen, die durch Bestimmung der Atmungsaktivität festgestellt wurden, fanden MERKER, WEDELL und NEUBERT (1964) sogar bei einer Umgebungstemperatur von 37 Grad erst nach 3o Min. Anoxie. Bei einer Temperatur von 5 Grad Celsius fanden diese Autoren nach 24. Std. Anoxie neben deutlich geschwollenen Mitochondrien noch fast völlig intakte vor. Andere Autoren (HÜBNER, 1961; HÖLSCHER, 1961) haben dagegen schon 1o. Min. nach Entnahme des Gewebes erste Veränderungen festgestellt. Da die Präparate zumeist in Methacrylat eingebettet waren, ist jedoch eine zusätzliche Schädigung durch das Einbettungsmittel wahrscheinlich.(MERKER, 1964, CAESAR, 1961). Bei allen Überlegungen zu der Frage, welche Relevanz morphologisch erkennbare Veränderungen der Mitochondrien auf ihre Funktion haben, muß beachtet werden, daß trotz schwerster funktioneller Störung oft keine fassbaren Modifikationen der Struktur sichtbar sind,

die eine Diagnosestellung aus dem Mikroskop erlauben (DAVID , 1961).

Sowohl Microbodies als auch Lysosomen zeigen, abgesehen von mäßigen Dichteveränderungen keine nennenswerten Umformungsprozesse. Das quantitative Verhalten beider Arten von Organellen ist über die beobachtete Zeit nahezu konstant.

Zusammenfassung:

Das Lebergewebe der Ratte, welches bis zur Dauer von 1 Std. in modifizierter Ringerlösung inkubiert worden war, wurde morphologisch und morphometrisch analysiert. Es ergeben sich schon unmittelbar nach Beginn der Stoffwechselschädigung signifikante strukturelle Veränderungen, die sich bis zum Ende der Untersuchungsdauer fortsetzen. Insbesondere sind folgende Befunde hervorzuheben:

1. Nach Inkubation in modifizierter Ringerlösung schwellen Leberzellen kostant; dabei schrumpft der Kern bis auf einen Minimalwert nach 3o Minuten. Bei vergleichenden Untersuchungen muß der Faktor des Volumenzuwachses in der morphometrischen Berechnung berücksichtigt werden.
2. Die Schwellung erfaßt ausschließlich die Zellen. Nach 3o Minuten ist der Extracellulärraum auch absolut verkleinert.
3. Die Inkubation der Leberzellen verursacht innerhalb kurzer Zeit einen außerordentlich starken Zerfall des Cytoplasmas, wobei in der Hauptsache das rauhe E.R. betroffen ist.
4. Mitochondrien sind hinsichtlich ihrer elektronenoptisch erkennbaren Struktur generell stabiler als bisher angenommen wurde.
5. Morphometrische Befunde sind abhängig von der Präparationsmethode insbesondere der Fixation. Für vergleichende Untersuchungen ist es unerläßlich, Zellen stets aus der selben Schicht unterhalb der intakten Organoberfläche zu verwenden.

LITERATURVERZEICHNIS

L I T E R A T U R

ALTMANN, H.W.,: Der Zellersatz, insbesondere an den parenchymatösen Organen. Verhandlg. dt. Gesellsch. f. Pathol. 50. Tagung, 15-51 (1966).

ALTMANN, H.W.: Allgemeine morphologische Pathologie des Cytoplasmas. Die Pathobiosen. Handb. der allgem. Pathologie II/1, 419-568, Springer-Verlag, Berlin, 1955.

BECKER, V.,: Morphologisches Äquivalentbild des äußeren und inneren Sauerstoffmangels. In Med. Grundlagen Bd. IV, 341-383, Ed. K. Fr. Bauer, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1959.

BENEKE, G. und SIMON, H.: Neuartige histomorphologische und histochemische Befunde beim akuten Tetrachlorkohlenstoffschaden der Rattenleber. Verhandlg. dt. Gesellsch. f. Pathol., 45. Tagung, 284-286 (1961).

BASSI, M. und BERNELLI-ZAZZERA, A.: Ultrastructural Cytoplasmic Changes of Liver Cells after Reversible and Irreversible Ischemia. Exp. Molec. Pathol. 3, 332-350 (1964

BERNELLI-ZAZZERA, A. und GAJA, G.: Some Aspects of Glycogen Metabolism Following Reversible or Irreversible Liver Ischemia. Exp. Molec. Pathol. 3, 351-368 (1964).

BÜRCK, H.C. und NETTER, H.: Das osmotische Verhalten als Kriterium für den Funktionszustand von Leberschnitten. Klin. Wschr. 38, 359-366 (1960).

BÜRCK, H.C.: Dissertation, Kiel (1958).

CAESAR, R.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen bei der Autolyse in vivo. Verhandlg. dt. Gesellsch. f. Path 45. Tagung, 278-283 (1961).

DALLNER, G., SIEKEVITZ, Ph. und PALADE, G.E.: Biogenesis of Endoplasmic Reticulum Membranes. I. Structural and Chemical Differentiation in Developing Rat Hepatocy J. Cell. Biol. 30, 73-96 (1966).

DAVID, H.: Submikroskopische Ortho- und Pathomorphologie der Leber. Akad. Verlag, Berlin, 1961

DAVID, H.: Submikroskopische Strukturveränderungen des Mitochondrion und seiner Bestandteile. Acta biol. med. germ. 7, 311-321 (1961).

DAVID, H.: Sterben und Tod der Zelle. In Subcell. Pathol., ed. by J.W. Steiner and H. Movat, Hoeber, New York, 19

DAVID, H., MARX, I. und UERLINGS, J.: Über die Beeinflussung postmortaler Strukturveränderungen des submikroskopische Leberbildes durch die Art des Einbettens. Z. med. Labortechnik 2, 219-232 (1961).

GREENGARD, O., FEDERMAN, M. und KNOX, W.E.: Cytomorphometry of Developing Rat Liver and its Application to Enzymi Differentiation. J. Cell Biol. 52, 261-272 (1972).

HAUG, H.: Die Treffermethode, ein Verfahren zur quantitative Analyse im histologischen Schnitt. Z. Anat. Entwic Gesch. 118, 302-312 (1955).

HECKMANN, K.: Zur Gewebsschwellung bei in vitro Inkubation. Virc Archiv Abt. B Zellpath. 2, 345-360 (1969).

HÖLSCHER, B., JUST, O.H. und MERKER, H.J.: Studies by Electron Microscope on Various Forms of Induced Cardiac Arr in Dog and Rabbit. Surgery, 49, 492-499 (1961).

HOPE, J.: Sterological Analysis of the Ultrastructure of Liv Parenchymal Cells During Pregnancy and Lactation. J. Ultrastruct. Res. 33, 292-305 (1970).

HÜBNER, H.H. und ROHR, H.P.: Elektronenmikroskopische und morpho metrische Untersuchungen der Rattenleberparenchym zelle unter besonderer Berücksichtigung der Micro bodies nach Acetylsalicylsäure. Beitr. Path. Anat. 139, 362-380 (1969).

HÜBNER, H.H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen bei Durch blutungssperre der Leber. Verhandlg. dt. Gesellsch f. Pathol., 45. Tagung, 286-290 (1961).

JORDAN, S.W.: Electron Microscopy of Hepatic Regeneration. Exp. Molec. Pathol. 3, 183-200 (1964).

KEMMER, Ch. und ZOTTER, St.: Zur Ultrastruktur der Leberparenchymzelle verschiedener Läppchenregionen bei neugeborenen Mäusen. I. Morphologische Befunde. Z. mikr anat. Forsch. 84, 357-371 (1971).

LOUD, A.V.: Quantitative Electron Microscopy of the Rat Liver Lobule. J. Cell Biol. 31, 69 A (1966).

LUND, A.V.: A quantitative Stereological Description of the Ultrastructure of Normal Rat Liver Parenchymal Cells. J. Cell Biol. 37, 27-46 (1968).

MEESEN, H.: Diskussion zu CAESAR, Verhandlg. dt. Gesellsch. f. Pathol., 45. Tagung, S. 283 (1961).

MERKER, H.J., WEDELL, J. und NEUBERT, D.: Biochemische und strukturelle Veränderungen an den Zellorganellen der Leber nach vollständiger Kreislaufunterbrechung Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharm. 249 85-116 (1964).

MÜLLER, E.: Der Zelltod, in BÜCHNER, F, LETTERER, R., ROULE, F. Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. 2/1 (1955)

POPPER, H. und SCHAFFNER, F.: Die Leber : Struktur und Funktion, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1961.

REITH, A., SCHÜLER, B. und VOGELL, W.: Quantitative und qualitativ elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Struktu der Leberplättchen normaler Ratten. Z. Zellforsch. 89, 225-240 (1968).

ROHR, H.P., STRUBEL, J. und BIANCHI, L.: Ultrastrukturelle morpho- metrische Untersuchung an der Leberparenhymzelle i der Frühphase der Regeneration nach partieller Hepatektomie, Beitr. Pathol. 141, 52-74 (1970).

ROHR, H.P., ANDERS, C. und BIANCHI, L.: Ultrastrukturelle morpho- metrische Untersuchung an der Leberparenchymzelle der Ratte nach Glucagon-Gabe (unter Berücksichtigu lysosomer Funktionsformen). Beitr. Pathol. 141, 313-326 (1970).

SITTE, H.; Morphometrische Untersuchungen an Zellen. In: Quantitative Methoden in der Morphologie, Ed. E.R. Weibel and H. Elias, Springer-Verlag, Berlin-Heide berg-New York, 1967.

SCHMIDT, M.: Morphometrische Analysen an Ehrlich-Ascitestumor- zellen. Dissertation, Homburg-Saar, 1971.

THEMANN, H.: Zur elektronenmikroskopischen Darstellung von Glykogen und die Beziehungen der Zellorganellen bei der Glykogensynthese und der Glykogenolyse. Verhandlg. dt. Gesellsch. f. Pathol., 45. Tagung, 291-296 (1961).

WEIBEL, E.R., KISTLER, G.S. und SCHERLE, W.F.: Practical Stereological Methods for Morphometrix Cytology. J. Cell Biol. 30, 23-38 (1966).

WEIBEL, E.R., STÄUBLI, W., GNÄGL, H.R. und HESS, F.A.: Correlated Morphometric and Biochemical Studies on the Liver Cell. I. Morphometric Model. Stereologic Methods and Normal Morphometric Data for Rat Liver. J. Cell Biol. 42, 68-91 (1969).

ZOTTER, St., KEMMER Ch. und SAUER, I.: Zur Ultrastruktur der Leberparonchymzelle verschiedener Läppchenregionen bei neugeborenen Mäusen. II. Morphometrische Untersuchungen. Z. mikr. anat. Forsch. 84, 470-484 (1971)

Herrn Prof. Dr. Kl. D. Heckmann danke ich für die Überlassung des Themas. Für stetes Interesse und fachliche Hilfe bin ich ihm sowie Herrn Prof. Dr. G. Werner zu besonderem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 8. Juni 1942 wurde ich als Sohn des prak. Arztes Dr. Alfred Ruf und dessen Ehefrau Melanie, geb. Müller in Bolchen (Lothringen) geboren.
1948 bis 1952 besuchte ich die Volksschule in Konz, anschließend trat ich in das Friedrich-Wilhelm Gymnasium Trier ein, an welchem ich 1963 meine Reifeprüfung ablegte. In Saarbrücken begann ich im Frühjahr 1963 das Medizinstudium. Mein Physikum bestand ich 1967; im Wintersemester 1970 das Staatsexamen. Die Medizinal-assistentenzeit absolvierte ich in der Landpraxis meines Vaters, im Krankenhaus Losheim/ Saar und im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Trier. Am 12. Mai 1972 erhielt ich meine Approbation.
In der Zwischenzeit legte ich den Stabsarzt in Glückstadt ab.

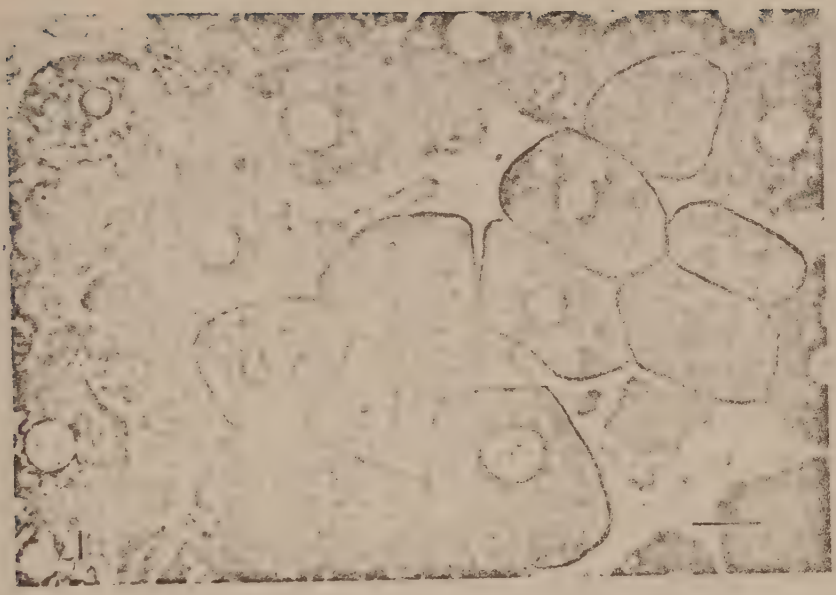
Hansjörg Ruf

Längenmarke bei lichtmikroskopischen und bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen schwacher Vergrößerung

10 µm

bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen stärkere Vergrößerung

1 µm



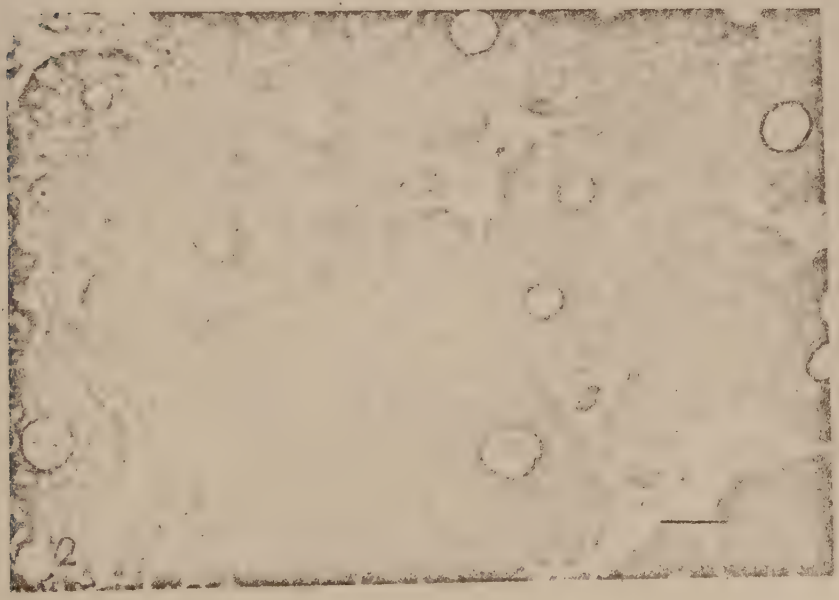


Abb. 1 u. 2 Lichtmikroskopische Aufnahmen eines Semidünnschnittes der Leber. Zur Bestimmung der Absolutwerte von Kern- und Zellvolumen sind die Konturen nachgezeichnet.

Abb. 3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Leber mit dem zur Auswertung benutzten Raster. Die Auszählung der Schnittpunkte über den betreffenden Strukturen ergibt deren relative Volumenanteile.

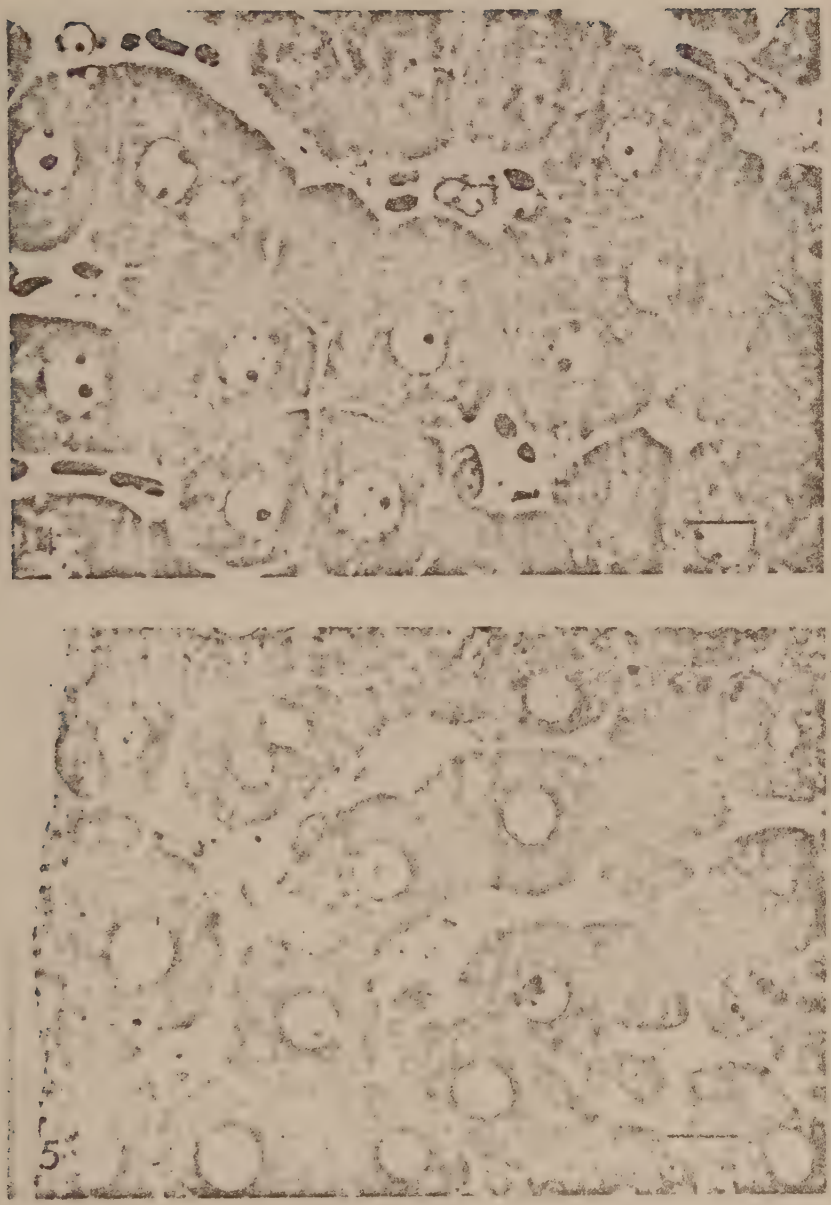
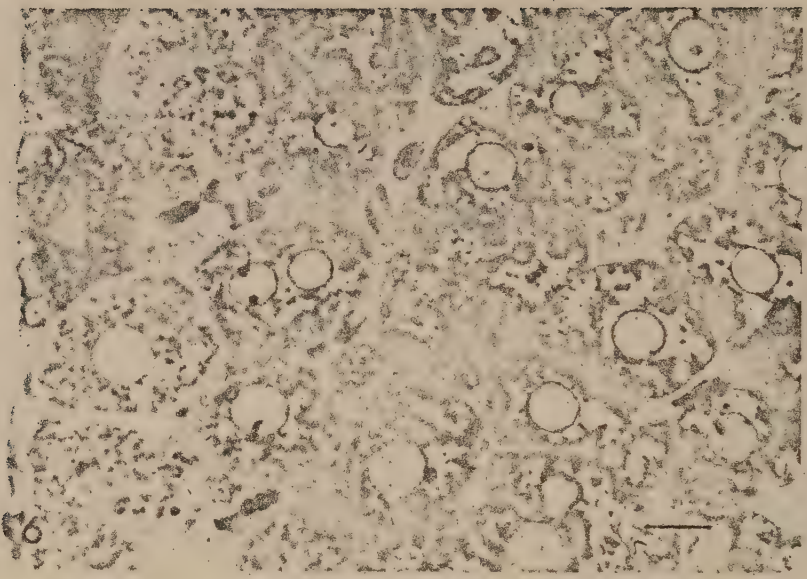


Abb. 4 u. 5 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Leber nach 0 bzw. -5 Minuten Inkubation.



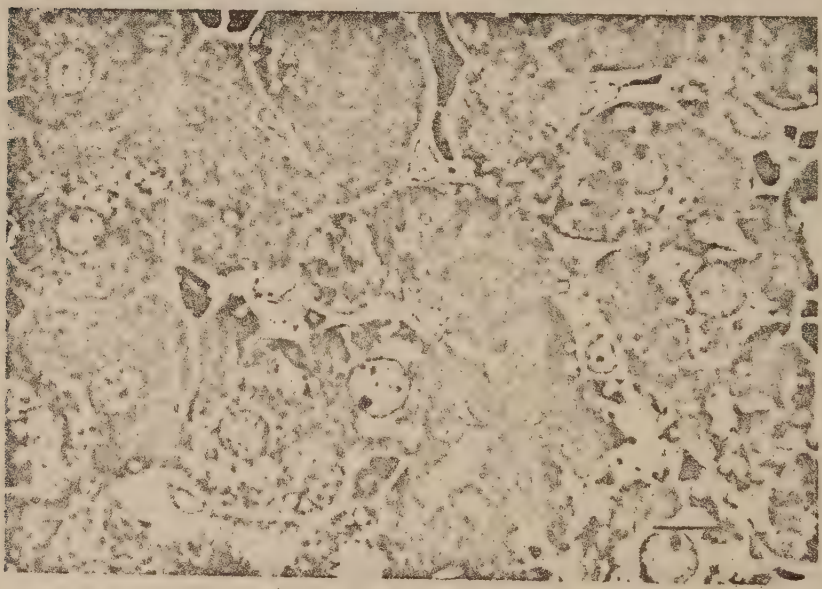
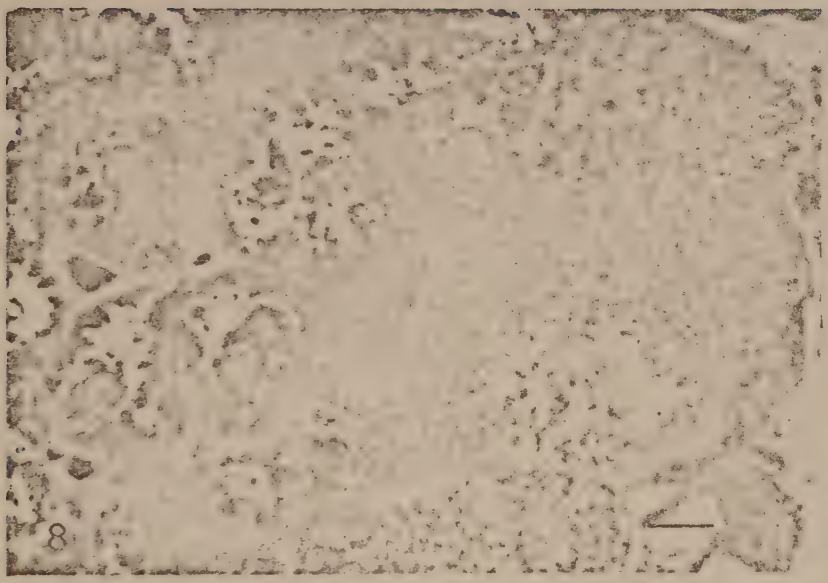


Abb. 6 u. 7 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Leber nach 10 bzw. 20 Minuten Inkubation.



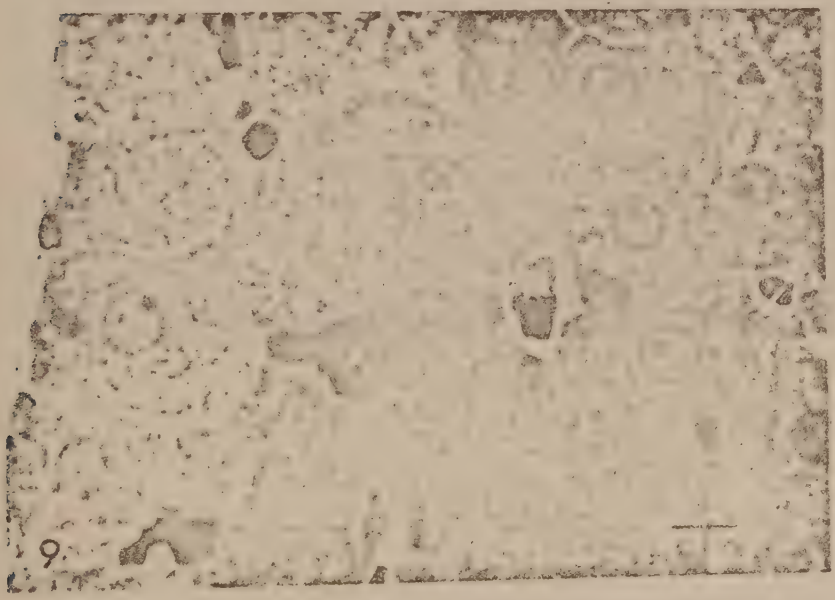


Abb. 8 u. 9 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Leber nach 30 bzw. 60 Minuten Inkubation.

Abb. 10 a u. b Elektronenmikroskopische Übersicht und stärkere Vergrößerung einer Leberzelle nach 0 Minuten.

10b

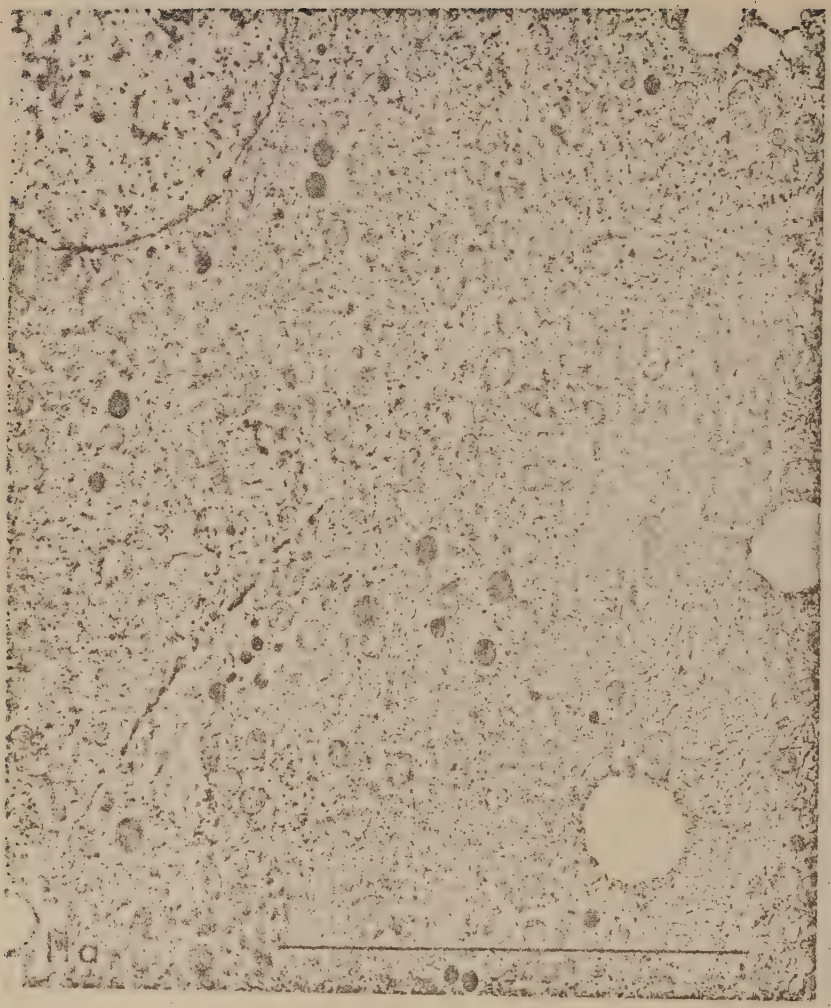


Abb. 11 a u. b Elektronenmikroskopische Übersicht und stärkere Vergrößerung einer Leberzelle nach 5 Minuten Inkubation.

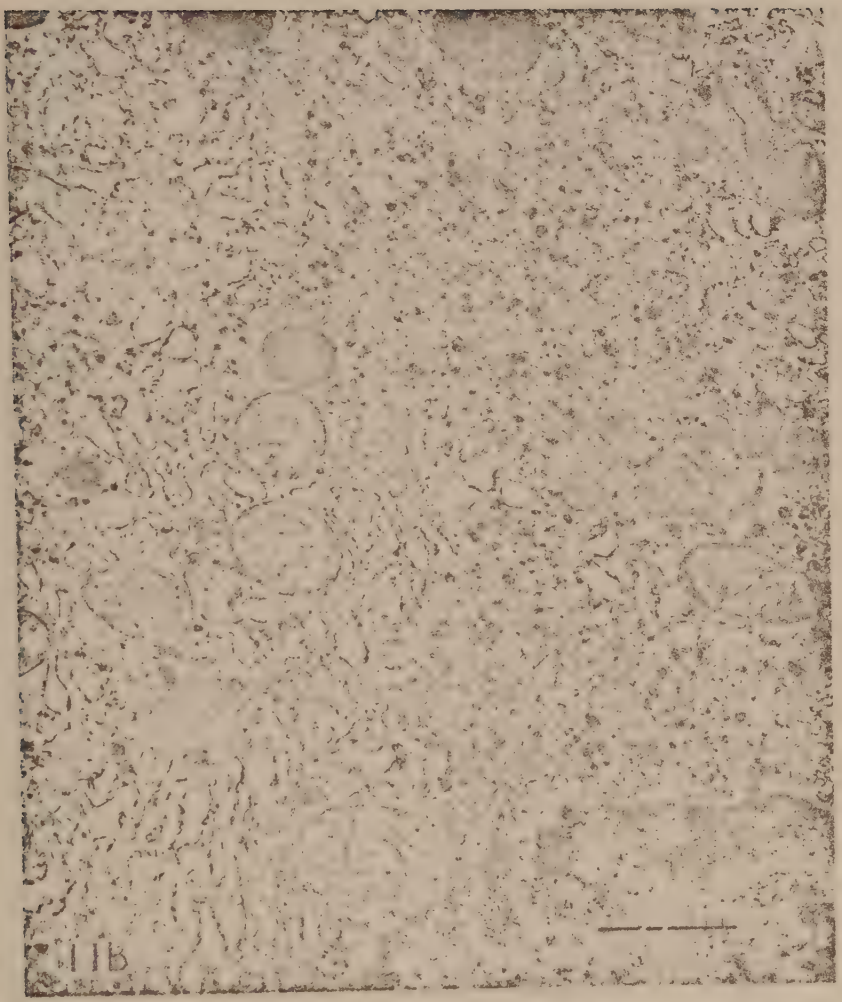

11b

Abb. 12 a u. b Elektronenmikroskopische Übersicht und stärkere Vergrößerung einer Leberzelle nach 10 Minuten Inkubation.

12b

Abb. 13 a u. b Elektronenmikroskopische Übersicht und stärkere Vergrößerung einer Leberzelle nach 20 Minuten Inkubation.

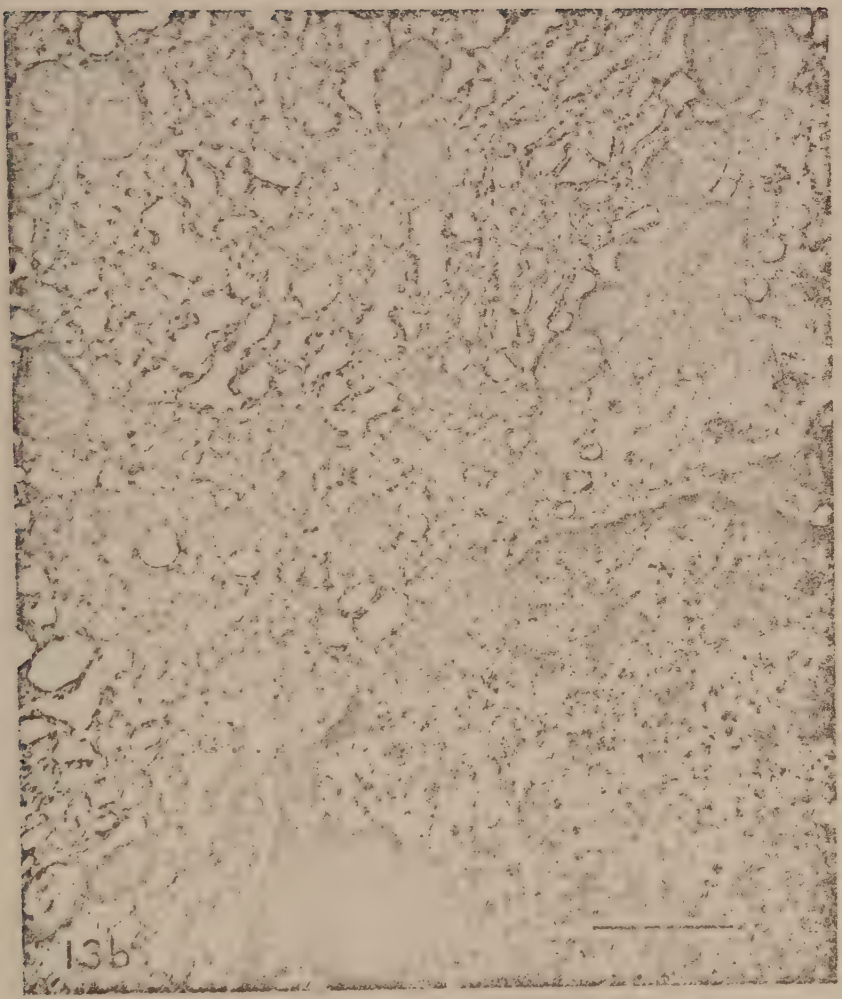
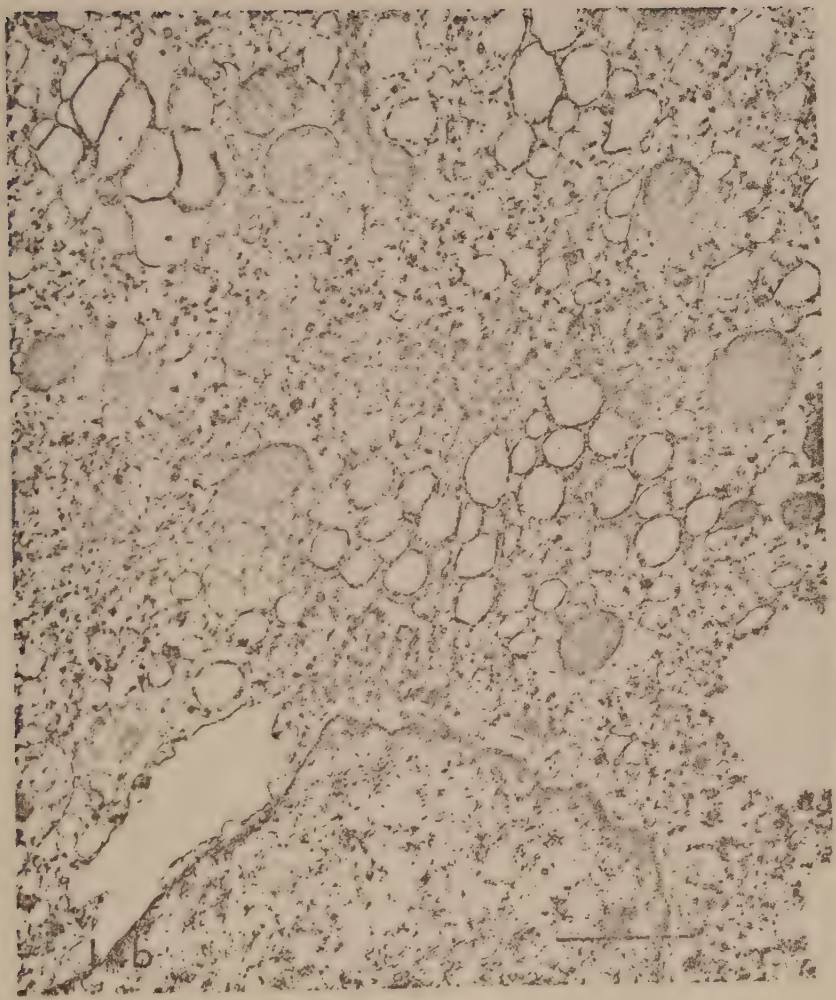

13b

Abb. 14 a u. b Elektronenmikroskopische Übersicht und stärkere Vergrößerung einer Leberzelle nach 30 Minuten Inkubation.


1 b

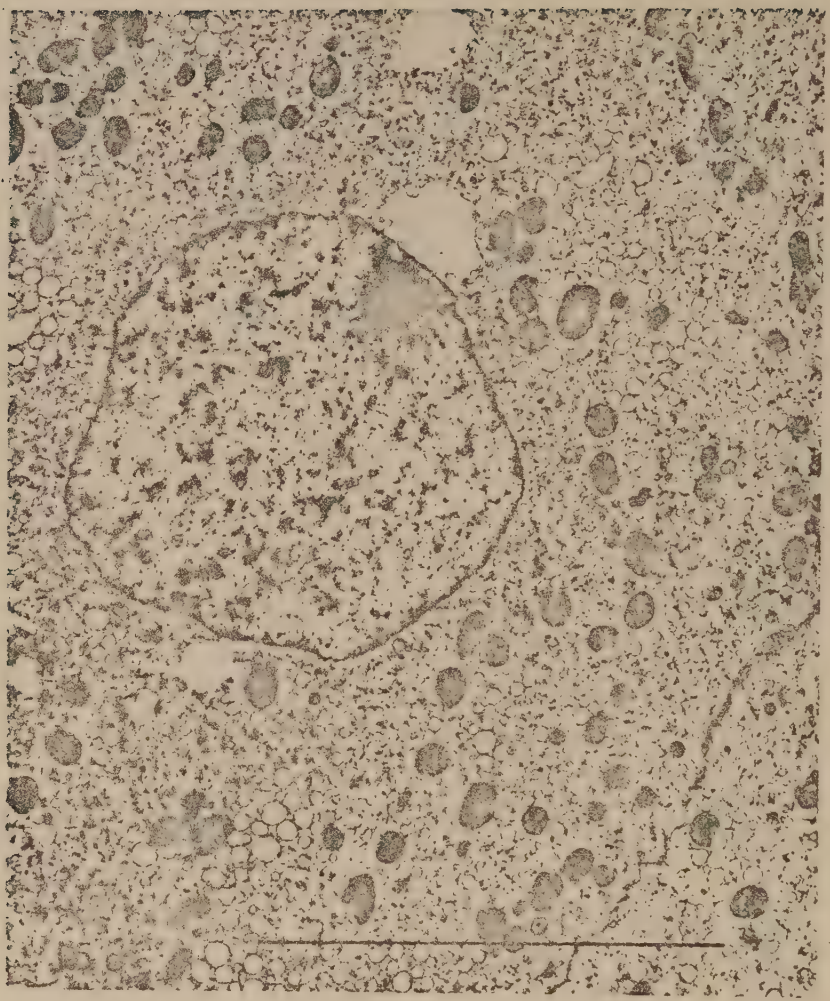


Abb. 15 a u. b Elektronenmikroskopische Übersicht und stärkere Vergrößerung einer Leberzelle nach 60 Minuten Inkubation.

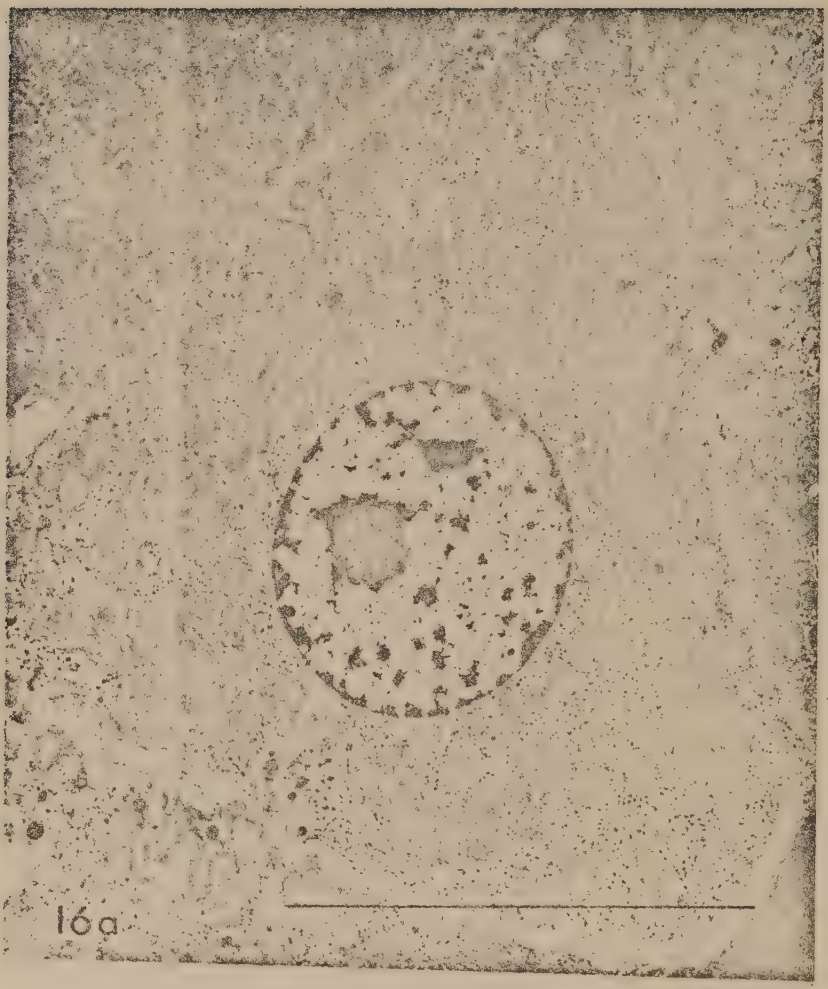


Abb. 16 a u. b Elektronenmikroskopische Übersicht und stärkere Vergrößerung einer mit Glutaraldehyd vorfixierten Leberzelle.

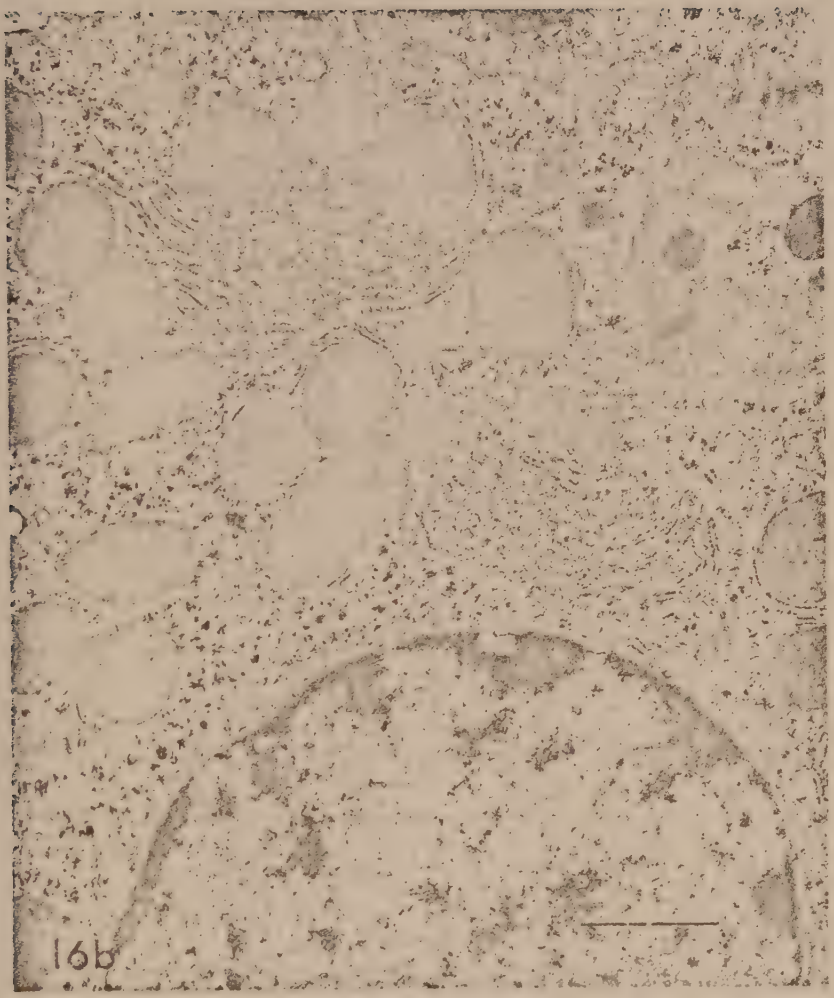

16b

Tabelle 1

Übersichtliche Darstellung der absoluten Volumina von Zelle und Kern pro Inkubationsdauer in μ^3 und deren mittlere Standardabweichungen. Darstellung des Zellzuwachsfaktors pro Intervall.

	0 Min.	5 Min.	10 Min.	20 Min.	30 Min.	60 Min.
Zelle	5191±117	5620±185	6039±87	6479±125	7390±169	7754±205
Kern	276±8,7	267±8,6	229±8,0	206±6,5	196±4,3	225±8,4
Faktor des Zellzuwachses	-	1,08	1,10	1,22	1,42	1,49

Tabelle 2

Darstellung der prozentualen Anteile von Zytoplasma, Kern und ICR am Gewebsschnitt pro Inkubationsdauer und ihre mittleren Standardabweichungen.

Inkubationsdauer	Zytoplasma	Kern	ICR
0 Min.	73,30±1,24	7,57±0,43	19,15±1,63
5 Min.	79,93±3,11	5,01±0,31	15,03±3,23
10 Min.	83,24±5,05	4,97±1,28	11,81±5,24
20 Min.	84,16±1,41	4,44±0,14	11,41±1,42
30 Min.	90,16±1,03	3,86±0,55	5,97±0,86
60 Min.	89,55±2,28	4,28±0,73	6,15 ± 1,64

Tabelle 3

Darstellung der prozentualen Volumenanteile der Zellkompartimente pro Inkubationsdauer und ihre mittleren Standardabweichungen.

Zeit	gran.Ret.	agran. Ret.	Mitochondrien	Mikrobodies	Lysosomen	Grundsubst.	Golgi-K
0 Min.	8,75±1,38	4,98±0,87	14,83±2,25	0,56±0,25	0,24±0,15	70,44±2,65	0,28±0,23
5 Min.	13,52±2,10	6,25±1,60	13,55±2,30	0,56±0,40	0,39±0,30	65,91±2,91	0,14±0,16
10 Min.	15,48±2,57	5,08±0,91	13,12±2,38	0,60±0,30	0,22±0,25	64,77±4,69	-
20 Min.	22,09±5,46	4,03±1,92	13,08±1,81	0,26±0,29	0,20±0,19	56,34±5,24	-
30 Min.	25,16±2,90	2,96±0,77	11,73±1,89	0,17±0,23	0,12±0,15	48,76±4,60	-
60 Min.	22,68±2,74	2,48±2,76	10,65±1,53	0,12±0,14	0,21±0,26	46,12±2,84	-

Tabelle 4

Darstellung der prozentualen Anteile von Zytoplasma, Kern und ICR am Gewebeschnitt pro Inkubationsdauer nach Einberechnug des Zellzuwachsfaktors. Die Prozentwerte sind auf das Volumen des unbehandelten Lebergewebes bezogen.

Inkubationsdauer	Zytoplasma	Kern	ICR	Zuwachsfaktor
0 Min.	73,30±1,42	7,57±0,43	19,15±1,69	-
5 Min.	86,32±3,11	5,41±0,31	16,23±3,23	1,08
10 Min.	91,56±5,05	5,46±1,28	12,99±5,24	1,10
20 Min.	102,65±1,41	5,41±0,14	13,92±1,42	1,22
30 Min.	128,08±1,03	5,23±0,55	8,47±0,86	1,42
60 Min.	133,45±2,28	6,37±0,73	9,16±1,64	1,49

Tabelle 5

Darstellung der prozentualen Volumenanteile der Zellkompartimente pro Inkubationsdauer nach Einberechnung des Zellzuwachsfaktors. Die Prozentwerte sind auf das Volumen der unbehandelten Leberzelle (abzügl. Kern) bezogen.

Zeit	gran. Ret.	agran. Ret.	Mitochondrien	Mikrobodies	Lysosomen	Grundsubst.	Zuwachsf.
0 Min.	8,75±1,38	4,98±0,87	14,83±2,25	0,56±0,25	0,24±0,15	70,44±2,65	-
5 Min.	14,60±2,10	6,75±1,60	14,63±2,30	0,60±0,40	0,42±0,30	71,18±2,91	1,08
10 Min.	17,03±2,57	5,58±0,91	14,40±2,38	0,66±0,30	0,24±0,25	71,25±4,69	1,10
20 Min.	26,95±5,46	4,91±1,92	15,90±1,81	0,31±0,29	0,24±0,19	68,73±5,24	1,22
30 Min.	35,70±2,90	4,10±0,77	16,65±1,89	0,24±0,23	0,17±0,15	69,24±4,60	1,42
60 Min.	33,79±2,74	3,69±2,76	15,86±1,53	0,17±0,14	0,31±0,26	68,72±2,84	1,49

Diagr. 1 Graphische Darstellung der Volumenentwicklung von Zelle und Kern über die Inkubationsdauer von 60 Minuten. Mittlere Standardabweichungen $<0{,}05$.

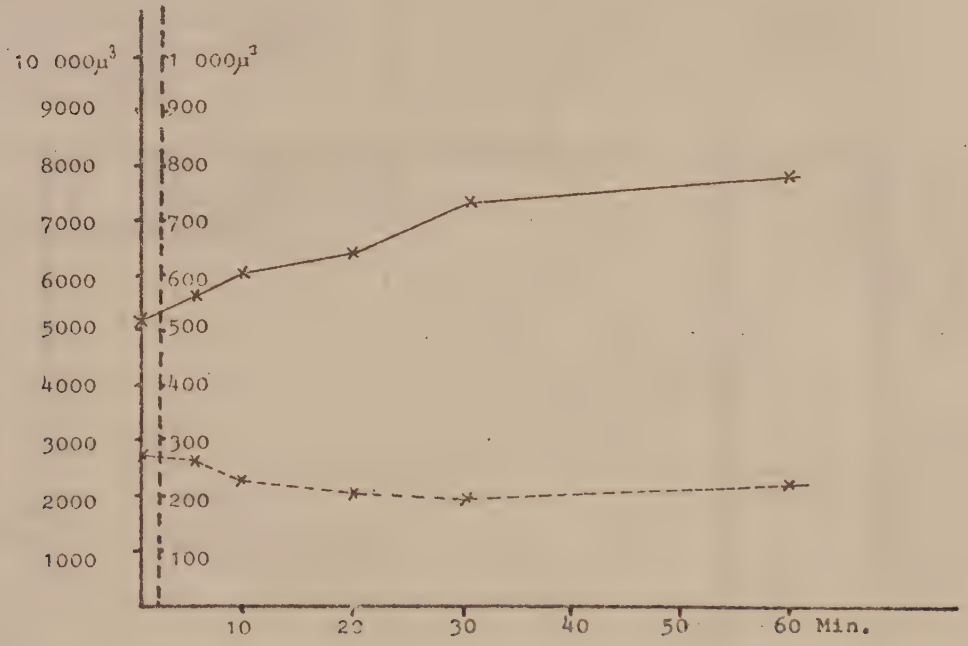
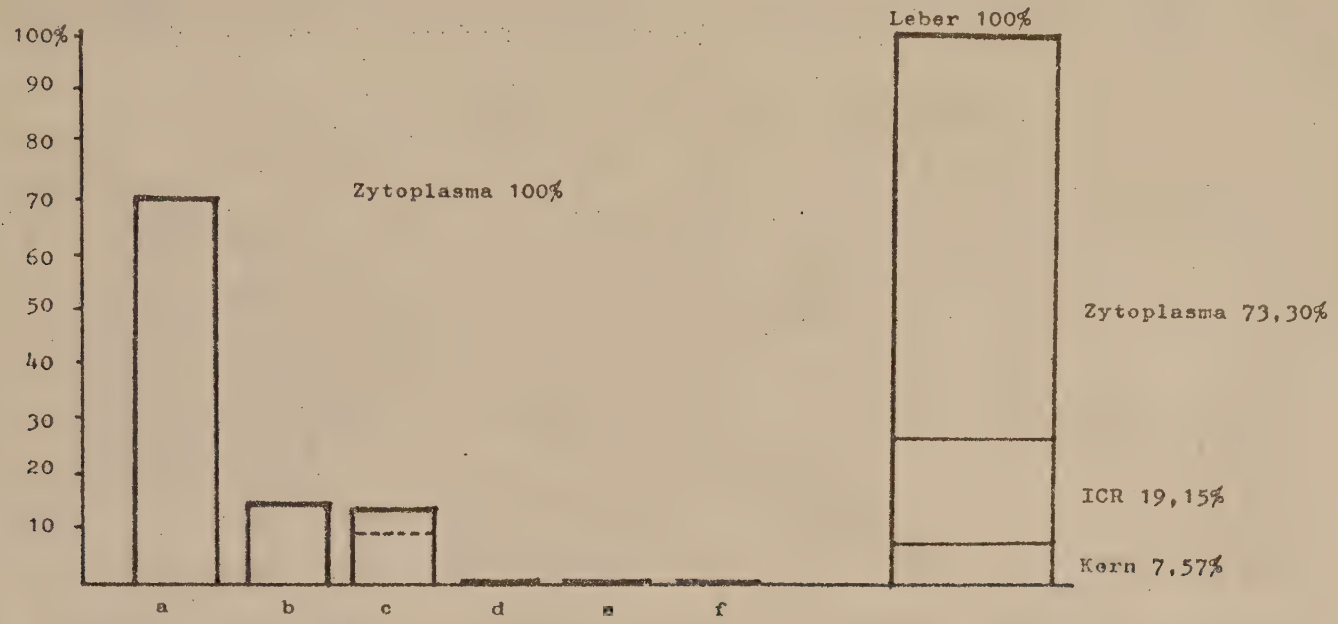
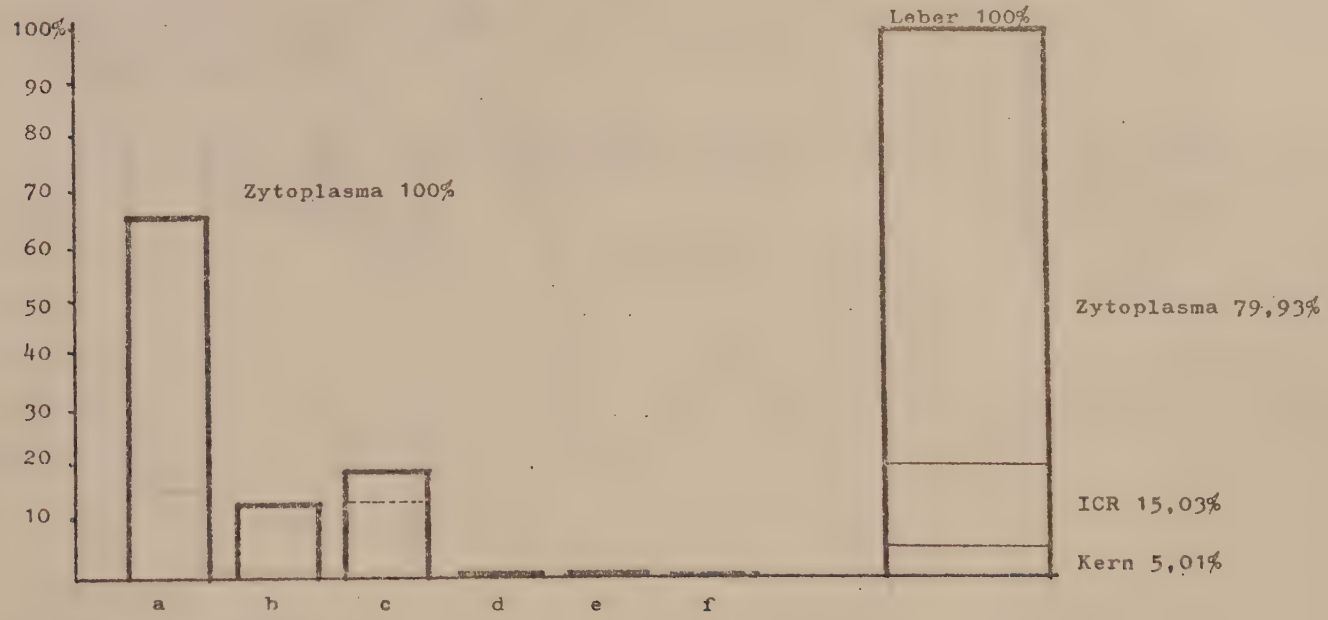


Diagramm 2 Prozentuale Volumenverteilung der Gewebskompartimente nach 0 Minuten.



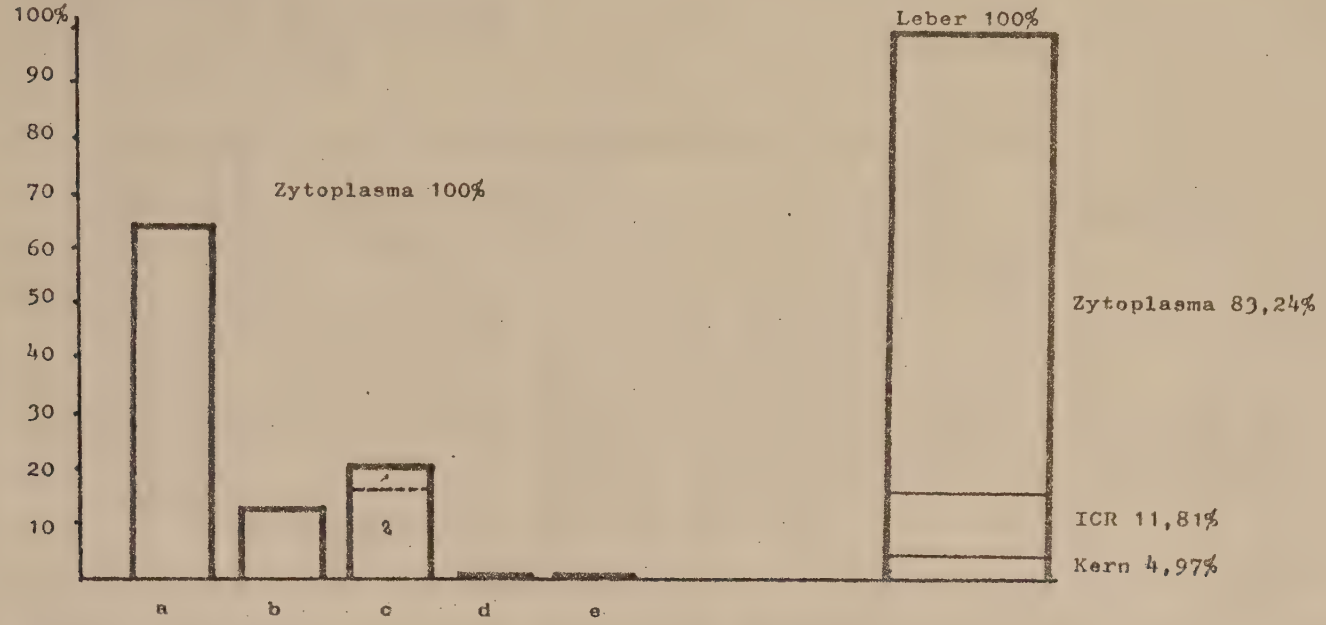
a= Grundsubstanz 70,44%
b= Mitochondrien 14,83%
c= gran. endopl. Retikulum 8,75%
c= agran. endopl. Retikulum 4,98%
d= Mikrobodies 0,56%
e= Lysosomen 0,24%
f= Golgi-Körper 0,28%

Diagr. 3 Prozentuale Volumenverteilung der Gewebskompartimente nach 5 Minuten Inkubation.



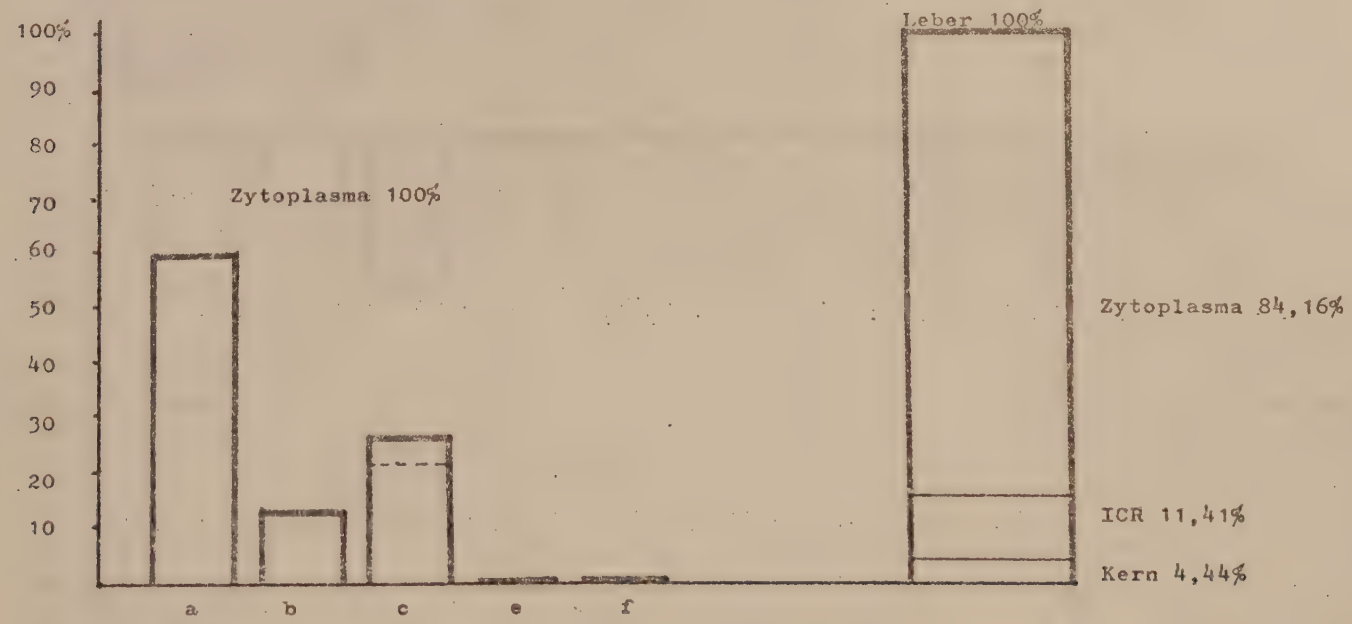
a= Grundsubstanz 65,91&
b= Mitochondrien 13,55%
c= gran. endopl. Retikulum 13,52%
c= agran. endopl. Retikulum 6,25%
d= Mikrobodies 0,56%
e= Lysosomen 0,39%
f= Golgi-körper 0,14%

Diagr. 4 Prozentuale Volumenverteilung der Gewebskompartimente nach 10 Minuten Inkubation.



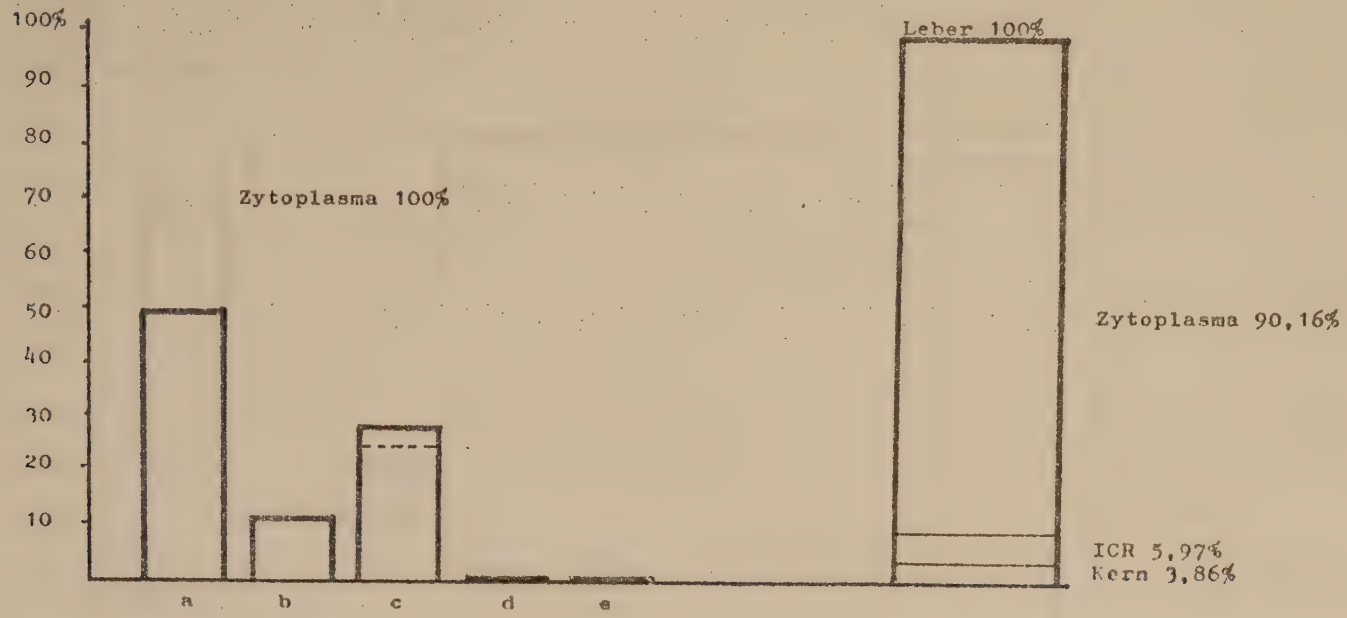
a= Grundsubstanz 64,77%
b= Mitochondrien 13,12%
c= gran. endopl. Retikulum 15,48%
c= agran. endopl. Retikulum 5,08%
d= Mikrobodies 0,60%
e= Lysosomen 0,22%

Diagr. 5 Prozentuale Volumenverteilung der Gewebskompartimente nach 20 Minuten Inkubation.



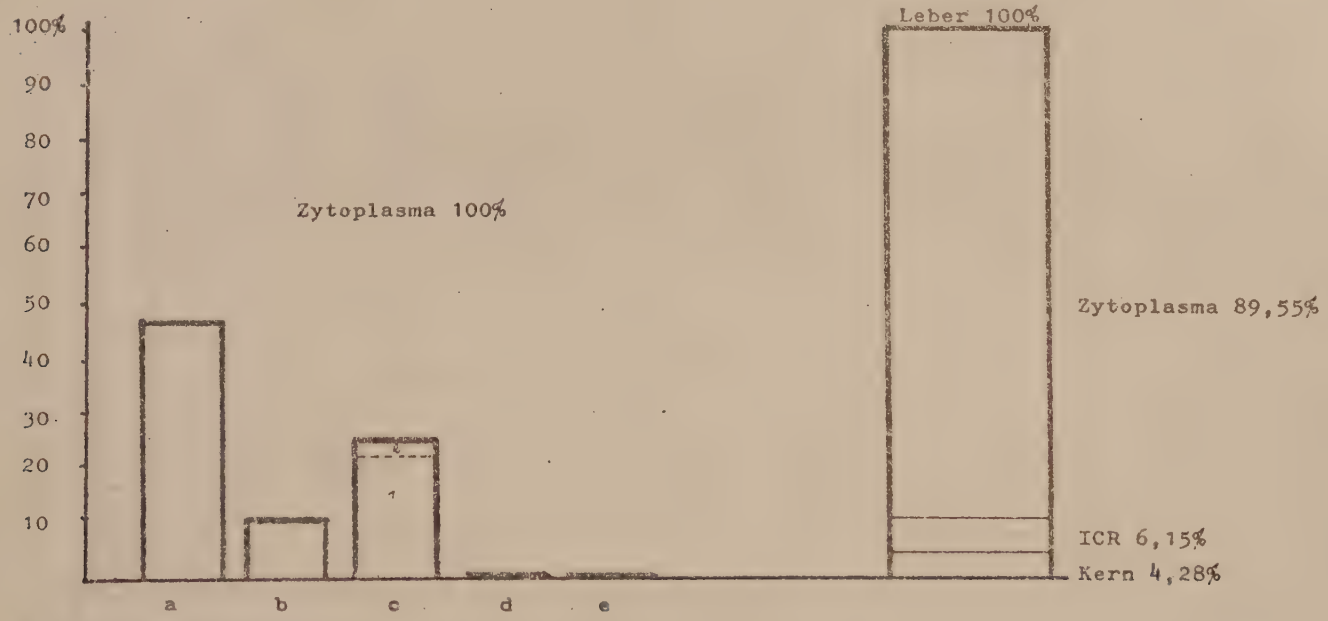
a=Grundsubstanz 56,34%
b=Mitochondrien 13,08%
c=gran. endopl. Retikulum 22,09%
c=agran. endopl. Retikulum 4,03%
d=Mikrobodies 0,26%
e=Lysosomen 0,20%

Diagr.6 Prozentuale Volumenverteilung der Gewebskompartimente nach 30 Minuten Inkubation.



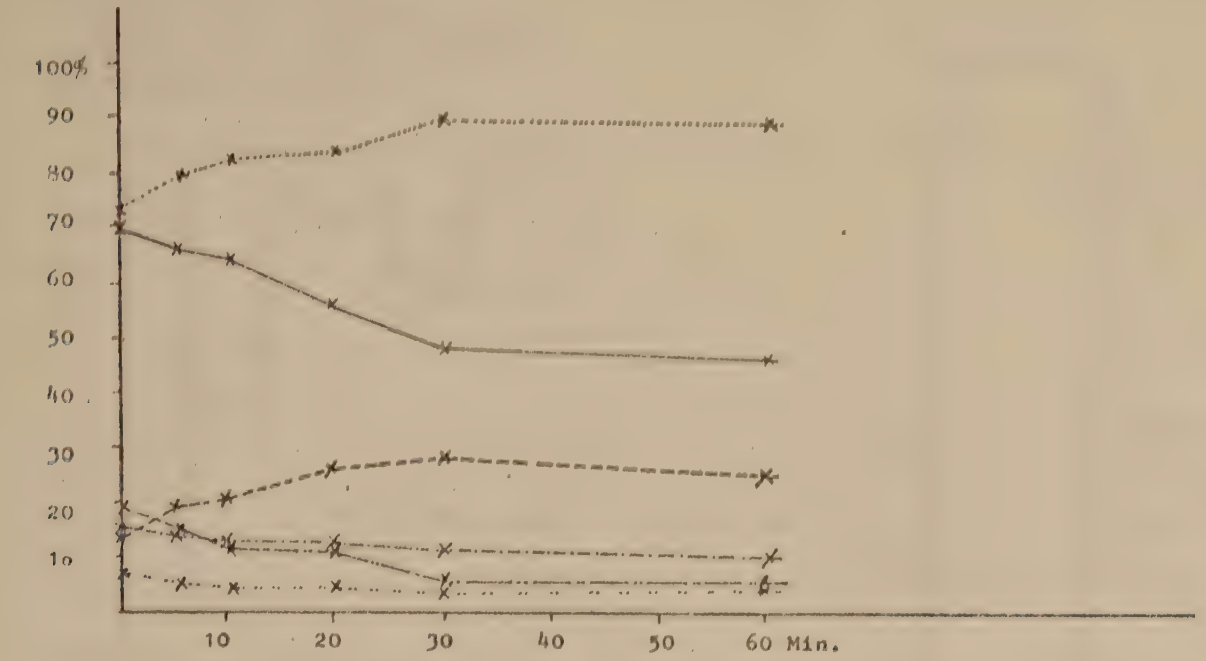
a =Grundsubstanz 48,76%
b =Mitochondrien 11,73%
c =gran. endoplasm. Retikulum 25,16%
c =agran. endoplasm. Retikulum 2,96%
d =Mikrobodies 0,17%
e =Lysosomen 0,12%

Diagr. 7 Prozentuale Volumenverteilung der Gewebskompartimente nach 60 Minuten Inkubation.

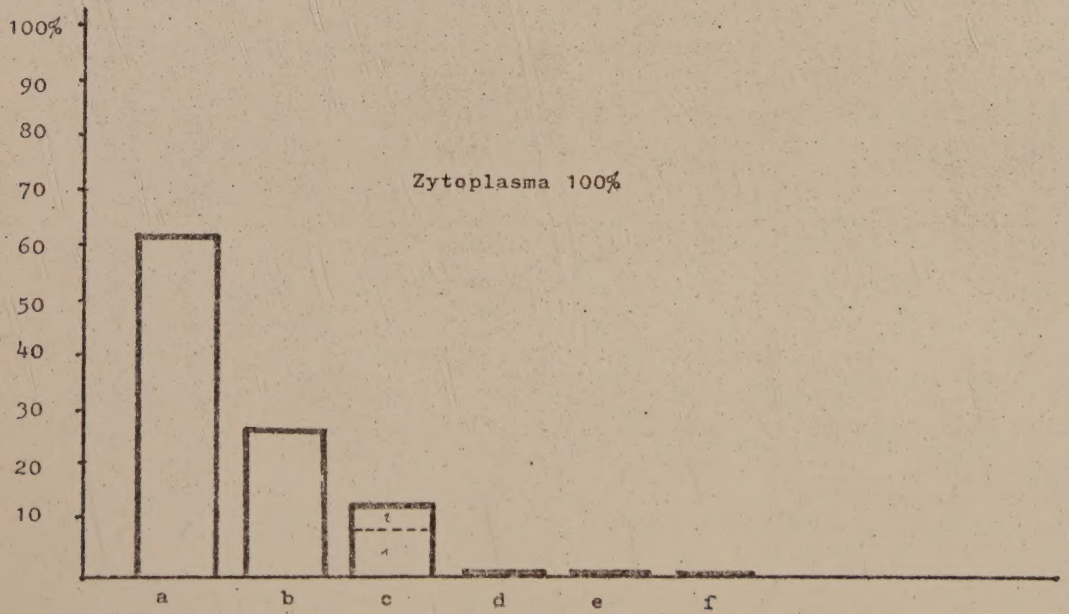


a= Grundsubstanz 46,12%
b= Mitochondrien 10,65%
c= gran. endopl. Retikulum 22,68%
c= agran. endopl. Retikulum 2,48%
d= Mikrobodies 0,12%
e= Lysosomen 0,21%

Diagr. 8 Prozentuale Volumenänderung einzelner Gewebskompartimente während 60 Minuten Inkubationsdauer.



Diagr. 9 Prozentuale Volumenverteilung der Zellkompartimente nach Doppelfixation in Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid.



a= Grundsubstanz 61,89% ± 5,29%
b= Mitochondrien 26,24% ± 5,41%
c= gran. endopl. Retikulum 6,44% ± 1,06%
c= agran. endopl. Retikulum 4,39% ± 1,06%
d= Mikrobodies 0,57% ± 0,71%
e= Lysosomen 0,97% ± 0,97%
f= Golgi-Körper 0,39% ± 0,51%